

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Neurosciences - Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Marc Dollmeyer

Thèse dirigée par **Alain Buisson**

préparée au sein de l'**institut des Neurosciences de Grenoble**
INSERM U836 – Equipe Neuropathologies et Dysfonctions
Synaptiques
dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Etude des atteintes morphofonctionnelles des synapses excitatrices dans la maladie d'Alzheimer: implication de la voie Cofiline-dépendante

Thèse soutenue publiquement le **16 décembre 2015**
devant le jury composé de :

Pr. Carine Ali

Professeur - Université de Caen Normandie - **Rapporteur**

Dr. Stéphane Martin

CR1 INSERM - CNRS - Sophia Antipolis - **Rapporteur**

Dr. Laurence Lafenechère

DR2 - CNRS - INSERM - Université Joseph Fourier - Grenoble -
Examineur

Dr. Olivier Nicole

CR1 - CNRS - Université de Bordeaux - **Examineur**

Pr. Remy Sadoul

Professeur - Université de Grenoble 1 - **Président du jury**

Pr. Alain Buisson

Professeur - Université de Grenoble 1 - **Directeur de thèse**



A ma famille, mes amis

A Kévin

La folie, c'est refaire toujours la même chose et s'attendre à un résultat différent

Albert Einstein

Plus j'apprends, moins je sais

Anonyme

*De la Grande Guerre naquirent les maux
De la main de Zeus, dans la boîte ils y furent enfermés
De la main de l'homonyme la boîte s'ouvrit
De tous relâchés seul l'Espoir resta
Dessous l'Espoir fut sauvé son parent
L'Humour...*

Marc Dollmeyer

Remerciements

Je tiens à remercier tous les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'être présents lors de la soutenance de thèse, et pour avoir jugé mes travaux : Mme Laurence Lafenechère, Mr Remy Sadoul, Mr Olivier Nicole, Mr Alain Buisson avec un remerciement tout particulier pour Mr Stéphane Martin et Mme Carine Ali en tant que rapporteurs.

En premier lieu au professeur Alain Buisson, mon directeur de thèse. Merci de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de l'institut des neurosciences de Grenoble, qui m'a permis de me dépasser, d'apprendre à évoluer en complète autonomie, et d'acquérir un bon bagage professionnel. Bien que parfois, j'ai eu le sentiment de couler, ces compétences acquises me seront utiles, peu importe mes nouveaux choix de carrière. Merci de m'avoir permis de participer au congrès de la Society for Neuroscience ed 2014 à Washington, où j'ai pu y présenter un poster. Merci de m'avoir permis d'encadrer plusieurs étudiants : Lucille Païta, Audrey le Naour, Claire Boïtet et d'autres dans une moindre mesure : Robin Magnard, Narine Van der Berg, Olivia de Montgolfier, Rebecca Powell et Perrine Tessier. Et merci particulièrement à Rebecca pour ton aide dans les relectures de refs express ;).

Un grand merci à tous les membres de l'équipe, encore présents ou partis. Merci à Pauline Gritti, ancienne technicienne, pour tous ces bons moments partagés. Merci à Karine Mora, notre super secrétaire, équipée d'une épaule d'acier pour les mauvais moments, merci de m'avoir soutenu dans cette épreuve, tu m'as été d'une grande aide et j'espère rencontrer à l'avenir des personnes aussi humaines que toi.

Merci à tous mes collaborateurs et collaboratrices : Muriel Jacquier, pour ton encadrement et ton enthousiasme, tes relectures et surtout tes super-pouvoirs de western-bloteuse ;). Sylvie Boisseau, pour ta bonne humeur et ta gentillesse, et tes magnifiques images d'IF☺. Mireille Albrieux, pour ta bonne humeur et ton sens critique. Eve, merci pour tes compétences en bio mol sans lesquelles je serai largué ! Merci également à José pour toutes les manips de FRAP et merci à Fabien.

Merci aux anciens membres de l'équipe. Merci à Travis pour tes compétences scientifiques, ta culture en neurosciences, et tout ce temps passé à me former en microscopie confocale. A Rebecca et Perrine, ça aura été un plaisir de travailler avec vous.

Merci à Karine Pernet-Gallay, mon ancienne encadrante de stage de M1, pour ton soutien moral en périodes de crise, pour ton bagage et ta culture en microscopie électronique, pour ton investissement dans mon projet, tes relectures, et pour l'engouement que j'ai eu à travailler avec toi autant en encadrante, qu'en collaboratrice.

Merci à Marta Rolland, Eléa Prezel, Christelle Aillaud, Charlotte Javalet, Benoît Boulan et Marine Laporte. Vous avez tous & toutes été d'un grand soutien et d'un bon œil critique sur mon projet, et je ne vous remercierai jamais assez pour cela. Merci à vous deux, Marta et Eléa, pour être vous, pour m'avoir écouté et compris. Surtout ne changez rien. Merci à toi Christelle pour ton écoute, sans jugement et ton réconfort. Nos pauses clope me manqueront

beaucoup ! Merci à toi Marine, pour ta compréhension, toutes nos discussions scientifiques, et tes conseils, notamment sur mon exigence et ma remise en question ☺ Nul doute que tu feras une belle passionnée de son métier.

Merci à Evelyne Lotito, pour tes autoclavages toujours impeccables et tes petits mots gentils quotidiens.

Merci à Yasmina Saoudi, mon ex collègue de gym, pour ta bonne humeur, ton caractère et ton soutien. J'ai vraiment apprécié tous les moments passés avec toi.

Merci à tous les doctorants du GIN avec qui nous avons pu organiser la première édition des rencontres européennes des jeunes chercheurs en neurosciences 2014.

Merci à Karin Pernet-Gallay et Christine Chatellard-Causse, pour m'avoir donné l'occasion d'intervenir au stand du GIN lors de la fête de la science ed 2013 & 2014.

Merci à Annie, Margaret, Nathalie, Georges, Bruno et Fabien.

Merci à tous les autres membres de l'institut des neurosciences de Grenoble que je n'ai pas remercié ici, mais avec qui j'ai interagit.

Merci à Christelle Breton et Magali Pourtier, directrice et gestionnaire de l'école doctorale, pour leur efficacité et leur écoute. Merci de m'avoir permis de faire partie du conseil de l'école doctorale en tant que représentant des doctorants. Merci de m'avoir permis d'organiser la journée d'appel du doctorant ed 2014, et d'avoir pu y participer sous forme de communication orale.

Merci à Catherine Guezzi, pour toutes nos conversations enrichissantes, pour ton humanité et ta considération que j'ai beaucoup appréciée.

Merci à tous mes amis qui m'ont soutenu, Maxime, Alizée, Aurore, Julien, Anaëlle, Stéphanie, Alissia, Lauriane, Stephen, merci d'avoir été là.

Un merci pour ma mère et ma sœur, qui m'ont soutenu pendant ces 3 années. Merci d'avoir été là, merci pour votre réconfort, même avec un petit coup de téléphone. Merci également à Héléna, Théophile, Renaud Arianne, Alain, Pierre et Hélène.

Merci à tous les anciens membres de 38Globule, notamment Manon Isaac et Hélène Ipas, avec qui j'ai pu participer à la création du Forum BioTechno2013, avec qui j'ai pu m'éclairer sur le monde du travail dans la recherche en industrie.

Un merci particulier à Marie-Lise Frandemiche, ancienne doctorante de l'équipe. Je n'ai jamais vu une personne aussi investie dans son travail. Tu m'as mis sur les rails alors que rien ne t'y obligeait. Tu as été celle qui m'as le mieux compris car ayant traversé les mêmes tempêtes doctorales. Merci pour ta culture et ton approche scientifique. Ca n'a pas été facile avec toi par moments surtout lors de remontages de bretelles de ta part alors que j'étais en pleine dépression. Mais tu as été un modèle pour moi sur le plan professionnel sous bien des aspects. Merci pour ce temps consacré à mon projet de plus ou moins ton plein grès☺. Merci

pour m'avoir également soutenu dans toutes les mauvaises passes de cette thèse. Merci pour ces injections de moral lorsque j'étais complètement perdu face à l'écriture. Et merci de faire partie de mon cercle d'amis. Que l'on se revoie plus tard ou pas je suis très heureux de t'avoir connu.

Merci à toi Lauriane, ma meilleure amie, pour ton soutien, ta compréhension lorsque je m'isolais. Pour tes conseils et ton expertise scientifique. Pour tes relectures. Pour tous les moments passés ensemble. Merci d'avoir été là. J'espère que tu trouveras the thèse of your life, qui continuera à te faire aimer ce métier ☺

Un dernier merci tout particulier pour toi Kévin. Le monde de la recherche t'était complètement inconnu. Il y a eu beaucoup de moments d'incompréhension entre nous vis-à-vis de mon travail. Mais tu as été d'un soutien sans faille et j'ai toujours pu me reposer sur toi quand je n'allais pas bien du tout. Tu as toi aussi subi les affres de cette thèse, mais nous sommes restés unis malgré cette épreuve. Nous en sommes sortis grandis tous les deux. Quelques années plus tard, nous rirons de tout cela ! Encore un grand merci mon cœur pour tout ce que tu as fait pour moi. Merci d'être là. Je t'aime.

Un dernier merci aux producteurs de café et machines senseo et bien sûr à Gutenberg.

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative caractérisée par une atrophie cérébrale progressive associée à une mort neuronale. Plus récemment, il a été suggéré que la perte des fonctions cognitives survenant pendant la maladie s'expliquait principalement par une atteinte au niveau synaptique préalable à la mort neuronale. Ainsi il a été observé que le peptide β -amyloïde ou A β , le constituant des plaques séniles, l'un des deux marqueurs histologiques de la maladie, existe sous une forme soluble/oligomérique (A β o), et cette conformation lui confère des propriétés synaptotoxiques. L'A β o agit préférentiellement sur le compartiment post-synaptique des synapses excitatrices également appelées épines dendritiques, structures sub-cellulaires dont la forme est régie par un cytosquelette d'actine riche et dynamique. Parmi les nombreuses hypothèses émises pour expliquer la synaptotoxicité de l'A β o, il a été suggéré que la disparition des épines était due à une dépolymérisation anormale des filaments d'actine par une enzyme : la cofiline. Pourtant des données récentes ont montré à l'inverse une phosphorylation/inactivation de la cofiline dans le cortex frontal de patients MA, mais aussi dans le cerveau de la lignée de souris APP/PS-1, modèle de MA. De plus, des analyses morphologiques des synapses de la région CA1 chez la souris APP/PS-1 ont montré une réduction de la densité d'épines, associée à une augmentation du volume des épines survivantes. Les variations de volume de la tête de l'épine sont des phénomènes très fréquents lors d'une induction de potentialisation à long terme, le corrélat électrophysiologique de la mémoire.

Au cours de ma thèse, nous avons cherché dans un premier temps à caractériser les altérations morphologiques des épines dendritiques chez la souris APP/PS-1 par microscopie électronique. Nous avons pu confirmer que dès 3 mois, les synapses excitatrices sont moins nombreuses, que les épines restantes sont plus larges, mais surtout, que l'épaisseur de la densité post-synaptique n'est plus proportionnelle à la surface de l'épine, ce qui suggère un découplage entre modifications morphologiques et fonctionnelles. Nous avons également mis en évidence la présence de spinules anormaux sur les épines.

En utilisant des cultures primaires de neurones corticaux, nous avons pu montrer qu'un traitement aigu avec de l'A β o induit la formation de protrusions riches en actine filamenteuse ressemblant aux spinules observés chez les animaux transgéniques. En purifiant la fraction post-synaptique, nous avons démontré que cette formation de protubérances est concomitante à une phosphorylation anormale de la cofiline induite par l'A β o. Ainsi l'inactivation de la cofiline qui en résulte pourrait être à l'origine d'une stabilisation et donc d'un allongement des filaments d'actine synaptique conduisant à la formation des protrusions. Cette inactivation de la cofiline a également été retrouvée chez la souris APP/PS-1 et chez l'humain. En conclusion, l'ensemble des résultats de cette thèse montre que l'A β o induit des déformations morphologiques des épines, qui ne sont pas activité-dépendantes, mais proviennent plutôt d'une dérégulation de l'activité enzymatique de la cofiline par l'A β o.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative pathology associated with progressive cerebral atrophy linked to neuronal death. It has been recently suggested that loss of cognitive functions occurring during the disease was a consequence of synapse dysfunction and prior to neuronal death. Thus, it has been observed that Amyloid- β peptide ($A\beta$), the main component of senile plaques, one of the histological markers of the disease, also exists as soluble/oligomeric $A\beta$ ($A\beta_o$). This $A\beta$ conformation is known to be synaptotoxic. $A\beta_o$ acts preferentially on the post-synaptic compartment of excitatory synapses, also named dendritic spines. These sub-cellular micro-domains contain dynamic and filamentous actin as their main cytoskeleton component. Among numerous theories explaining $A\beta_o$ synaptotoxicity, it has been suggested that spine collapsing was due to an abnormal actin depolymerisation through Cofilin1 enzyme. Yet, recent evidence inversely showed Cofilin1 phosphorylation/inactivation in the frontal cortex of AD patients and in the APP/PS-1 transgenic mice brain, an AD animal model. Moreover, synapse morphological analysis in the CA1 region of APP/PS-1 mice showed a reduction in spine density and an increase in spine head volume of remaining ones. Spine head volume variations are commonly occurring during induction of Long Term Potentiation, the electrophysiological correlate of memory.

During my thesis, we firstly characterized APP/PS-1 mice dendritic spine morphological alterations using electron microscopy. We confirmed that even at 3 months-old, excitatory synapses are fewer, but also that remaining ones display larger surfaces. In addition, PSD thickness is not proportional to spine surface anymore, which suggests an uncoupling between functional and morphological modifications. We also demonstrated the presence of abnormal shaped spinules onto spines.

Using primary cortical neuron cultures, we demonstrated that acute $A\beta_o$ treatment induces the formation of filamentous actin enriched protrusions, resembling abnormal spinules observed in transgenic mice. By purifying the post-synaptic protein fraction, we showed that protrusion formation is correlated to an abnormal Cofilin1 phosphorylation/inactivation by $A\beta_o$. Thus, resulting Cofilin1 inactivation could trigger actin filament stabilization, leading to protrusion formation. We also found Cofilin1 phosphorylation in APP/PS-1 mice and in AD brains. Taken together, these results show that $A\beta_o$ triggers abnormal alterations of dendritic spines, and spinules. These protrusions are not activity-dependent, but may instead originate from a dysregulation of Cofilin1 enzymatic activity by $A\beta_o$.

Liste des abréviations

A β : Peptide Amyloïde-Bêta

A β o : Oligomère d'A β

ABP : Actin Binding Protein/ famille de protéines se liant à l'actine

Actine-F : Actine filamenteuse/ polymérisée

Actine-G : Actine globulaire ou monomérique

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase/ famille d'enzymes à activité α -sécrétase coupant l'APP

ADDL : A β -derived diffusible ligand/ synonyme d'A β o

ADF: Actin Depolymerising Factor/ facteur dépolymérisant de l'actine, membre de la famille des ADF/Cofilin

ADP : Adénosine Di-Phosphate

AICD : APP IntraCellular Domain/ fragment C-terminal de la protéolyse de l'APP

AMPA : acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique

AMPA_r : Récepteur AMPA

APH-1 : anterior pharynx-defective-1/ protéine sous-unitaire du complexe BACE-1

ApoE : Apolipoprotéine E

APP: Amyloid Precursor Protein/ Protéine Précurseur de l'Amyloïde- β

AP5 : acide _{D,L}-2-amino-5-phosphonopentanoïque

Arp2/3 : Actin Related Complex 2/3. Complexe protéique multimérique induisant la formation de nouveaux filaments d'actine à partir d'anciens

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BACE-1 : β -site APP Cleaving Enzyme 1 / complexe multienzymatique à activité β -sécrétase coupant l'APP

Bin-1 : Bridging Integrator 1/ protéine adaptatrice impliquée dans l'endocytose clathrine-dépendante

Cam-KII : protéine kinase II calcium-calmoduline dépendante

CA1 : Zone 1 de la Corne d'Ammon, aire de l'hippocampe très étudiée pour ses phénomènes plastiques.

CREB : cAMP response element-binding protein/ facteur de transcription activé par Erk

Erk : Extracellular-signal Regulated Kinase/ protéine kinase régulée par signal extracellulaire

FTDP-17 : Démence Fronto-Temporale et Parkinsonisme lié au chromosome 17

GABA : Acide γ -aminobutyrique

GABAr : Récepteur GABA

GDP: Guanosine Di-Phosphate

GTP: Guanosine Tri-Phosphate

KPI: Kunitz Protease Inhibitor Domain/ domaine protéique inhibiteur de la Kunitz protease

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

Lim-k : protéine kinase à domaine LIM phosphorylant la cofiline en sérine3

LTP : Long Term Potentiation/ Potentialisation à Long Terme

MA : Maladie d'Alzheimer

MAGUK : Membrane Associated Guanylate Kinase/ famille de protéines structurales post-synaptiques

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase/ famille de protéines kinases activée par facteur mitotique

MTOC : MicroTubule Organisation Center/ centre de polymérisation des microtubules.

MT5-MMP : Matrix Metaloprotease/ métalloprotéase de la matrice, liée à la membrane

NFT : Neuro-Fibrillary Tangle/ enchevêtrement neuro-fibrillaire

NPF : Nucleation Promoting Factor/ facteur promoteur de nucléation

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

NMDAr : Récepteur NMDA

N-WASP : Neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome Protein/ activateur d'Arp2/3

PAK : p21-Activated Kinase

PEN-2 : Presenilin enhancer-2/ protéine sous-unitaire du complexe BACE-1

PHF : Paired Helical Fragment/ filament apparié en hélice

Pi: Phosphate Inorganique

P₁P₂ : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate

P₁P₃ : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PPSE : Potentiel Post- Synaptique Excitateur

PPSI : Potentiel Post- Synaptique Inhibiteur

PSD : Densité Post-Synaptique

PS-1/PS-2 : Preséniline1/Preséniline2

REL: Réticulum Endoplasmique Lisse

Rock : Rho-associated protein Kinase

SNC : Système Nerveux Central

SSH : slingshot, protéine à activité cofiline-phosphatase.

TARP : Transmembrane AMPAr Related Protein/ Famille de protéines associées aux AMPAr

TESK : protéine kinase relative aux testicules phosphorylant la cofiline en sérine3

WAVE : WASP-family Verprolin-homologous protein/ homologue de N-WASP

Avant-propos

Au cours des cent dernières années et grâce à son intellect, l'homme a su repousser les frontières de la mort en développant des stratégies toujours plus innovantes afin de contrer les affres du temps et de la nature, et ainsi allonger son espérance de vie. L'un des résultats immédiats à ce bouleversement est l'augmentation de la proportion d'individus âgés. Or la maladie d'Alzheimer est une pathologie neuro-dégénérative qui touche pour une grande part les personnes âgées. Avec l'augmentation exponentielle d'une humanité vieillissante, les enjeux économiques, sociétaux et moraux liés à la maladie d'Alzheimer croissent donc chaque année.

La Maladie d'Alzheimer se caractérise notamment par une perte des processus mnésiques, telle la mémoire antérograde. Au niveau cellulaire, la mémoire se caractérise par l'établissement durable de zones de contacts entre neurones appelées synapses. Les synapses peuvent perdurer pendant des décennies, être modifiées/supprimées. Ce sont les substrats de l'apprentissage de nos expériences. La mémoire (qu'elle soit procédurale soit liée à notre intellect, ou épisodique donc liée à notre affect) est donc une composante cognitive déterminante au bon fonctionnement psycho-biologique du corps humain et une atteinte de cette capacité peut entraîner de graves complications sur l'individu, notamment la perte de son autonomie. La maladie d'Alzheimer se caractérise justement par une atteinte et une élimination des synapses, cause directement liée aux signes cliniques de démence rencontrés dans la pathologie.

Avec de tels impacts de la maladie d'Alzheimer sur notre société, il est ainsi aisé d'imaginer l'enjeu d'une compréhension approfondie des processus moléculaires de mise en mémoire à la synapse, afin d'établir un diagnostic des perturbations de ces processus dans la maladie d'Alzheimer. Comprendre et contrer les atteintes mécanistiques des processus mnésiques permettront de consolider les processus de mémorisation chez les patients.

Table des matières

| | |
|--|----|
| Chapitre 1 : La Maladie d'Alzheimer | 4 |
| 1. Vieillesse mondiale et démence | 4 |
| 2. La Maladie d'Alzheimer | 4 |
| 2.1. Statistiques | 4 |
| 2.2. Historique | 5 |
| 2.3. Physiopathologie | 6 |
| 2.3.1. Lésions tissulaires | 6 |
| 2.3.2. Les enchevêtrements neurofibrillaires | 7 |
| 2.3.3. Les plaques séniles | 8 |
| 2.3.4. Le peptide A β | 9 |
| 2.3.4.1. Agrégation | 9 |
| 2.3.4.2. Synthèse | 10 |
| 2.4. Les facteurs de risques | 12 |
| 2.4.1. Les facteurs héréditaires | 12 |
| 2.4.1.1. ApoE et Bin-1 | 12 |
| 2.4.1.2. APP et PS-1 | 12 |
| 2.4.2. Les facteurs environnementaux | 13 |
| 2.4.3. Les facteurs protecteurs | 13 |
| 2.5. A β et synaptotoxicité | 14 |
| Chapitre 2 : La Synapse | 16 |
| 1. La synapse | 16 |
| 1.1. Les différents types de synapses | 16 |
| 1.1.1. La synapse électrique | 16 |
| 1.1.2. La synapse chimique | 16 |
| 1.2. L'épine dendritique | 18 |
| 1.2.1. Historique | 18 |
| 1.2.2. Morphologie des épines dendritiques | 19 |
| 1.2.2.1. Les épines « filopodes » | 21 |
| 1.2.2.2. Les épines « stubby » | 22 |
| 1.2.2.3. Les épines « thin » | 22 |
| 1.2.2.4. Les épines « branched » | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 1.2.2.5. Les épines « mushroom »..... | 22 |
| 1.2.3. Morphogénèse des épines dendritiques | 23 |
| 1.2.4. Un cas particulier, les spinules et synapses perforées | 24 |
| 1.2.4.1. Descriptif..... | 24 |
| 1.2.4.2. Rôle des spinules | 25 |
| 1.2.4.3. Tête et cou : implications dans la compartimentation biochimique et électrique des épines dendritiques..... | 29 |
| 2. La PSD..... | 30 |
| 2.1. Les récepteurs AMPA | 31 |
| 2.2. Les récepteurs NMDA..... | 32 |
| 2.3. Partenaires des AMPAr et NMDAr : exemples d'interaction avec PSD-95..... | 32 |
| 3. La plasticité synaptique | 32 |
| 3.1. Découverte de la potentialisation à long terme | 33 |
| 3.2. Mécanismes moléculaires de la LTP | 34 |
| 3.2.1. Généralités | 34 |
| 3.2.2. La kinase Erk | 37 |
| Chapitre 3 : l'Actine et la Plasticité Synaptique..... | 39 |
| 1. Biochimie de l'actine | 39 |
| 1.1 L'actine-G monomérique | 39 |
| 1.2. Assemblage de l'actine : une dynamique en tapis-roulant | 40 |
| 2. Les Actin Binding Proteins | 43 |
| 3. L'ADF/Cofiline..... | 48 |
| 3.1. Structure et fonction | 48 |
| 3.2. Les régulateurs de la cofiline | 51 |
| 3.2.1. Les protéines G | 53 |
| 3.2.2. Substrats des Rho-GTPases..... | 54 |
| 4. Couplage moléculaire des modifications morphologiques et fonctionnelles | 56 |
| Chapitre 4 : Synaptotoxicité et Aβo | 59 |
| 1. Une atteinte de la signalisation NMDAr-dépendante | 59 |
| 2. Des altérations actine-dépendantes de la morphologie des synapses | 61 |
| 3. La souris APP/PS1 | 63 |
| Objectifs..... | 65 |
| Chapitre 5 : Résultats..... | 67 |

| | |
|--|-----|
| Chapitre 6 : Discussion | 100 |
| 1. Altérations morphologiques des épines chez la souris APP/PS1 | 100 |
| 2. Evolution des spinules en présence d'A β o..... | 101 |
| 3. Remodelages A β o-dépendants du réseau d'actine dans l'épine | 101 |
| 4. Altération de la régulation cofiline-dépendante de l'actine-F par A β o..... | 103 |
| 5. Implication de la voie RockII/Limk1/Cofilin1 dans la synaptotoxicité A β o-dépendante | 104 |
| 6. Agent causal : A β o intra ou extracellulaire ? | 104 |
| 7. Altération possible de la voie activatrice de la Cofilin1 par A β o via slingshot | 105 |
| 8. Modèle hypothétique d'effondrement synaptique : implication de tau | 108 |
| Chapitre 7 : Perspectives | 110 |
| 1. La cofiline dans les autres maladies neurologiques | 110 |
| 2. Les spinules : un index de plasticité structurale sous estimé | 110 |
| 3. Une nouvelle utilité possible du fasudil | 111 |
| Annexes | 112 |
| Références | 116 |

Chapitre1 : La Maladie d'Alzheimer

1. Vieillissement mondial et démence

Le progrès technologique humain s'est considérablement accéléré au cours des 100 dernières années. L'homme a développé quantité de stratégies thérapeutiques visant à réduire le nombre de décès liés aux maladies, et à augmenter l'espérance de la vie humaine. Cette quête de la guérison a eu pour conséquence de générer un processus appelé « transition démographique » qui se caractérise par un vieillissement de la population et qui implique une diminution de la mortalité et de la natalité.

L'une des principales conséquences du vieillissement mondial est l'émergence de pathologies liées à la vieillesse, telles les démences. D'après le dictionnaire médical Larousse, le terme de démence se réfère à un appauvrissement psychique profond associé à une perte de l'attention, de la mémoire, des capacités cognitives (tel le calcul), une perte des critères de références éthiques et sociales et une désorientation spatio-temporelle. Les démences affectent donc grandement la capacité d'un individu à interagir avec son environnement et peuvent aboutir à une perte partielle/totale de l'autonomie. Ainsi, les démences soulèvent de véritables problématiques humaines, sociales et économiques.

2. La Maladie d'Alzheimer

2.1. Statistiques

Parmi tous les cas de démences, la maladie d'Alzheimer (MA) est à l'origine d'environ 6 cas sur 10. Liée au vieillissement, elle n'affecte que 2 % des moins de 65 ans et ces cas sont généralement liés à des formes héréditaires que nous exposerons plus loin. En revanche, elle affecterait jusqu'à 4 % des plus de 65 ans, et 15 % des plus de 80 ans. On compte ainsi en France plus de 900 000 individus affectés par la Maladie d'Alzheimer. D'après le World Alzheimer Report édition 2015, le monde compte 46,8 millions de personnes atteintes de démence cette année. En 2030 ce chiffre gonflera jusqu'à 74,7 millions d'individus, dont près de 70 % de cas seront imputables à la MA.

2.2. Historique

Tout commence le 25 Novembre 1901 à l'hôpital de Frankfort où exerce le praticien allemand Aloïs Alzheimer. Ce jour-ci, le Dr Alzheimer reçoit pour la première fois sa nouvelle patiente Mme Auguste Dieter, âgée de 51ans (Figure 1). Cette dernière présente un ensemble de troubles cognitifs très marqués. Le Dr Alzheimer notera entre autres, une réduction de la compréhension du langage et de la mémoire, une aphasie très prononcée, un comportement imprévisible, de la paranoïa et des hallucinations auditives (Maurer et al., 1997).

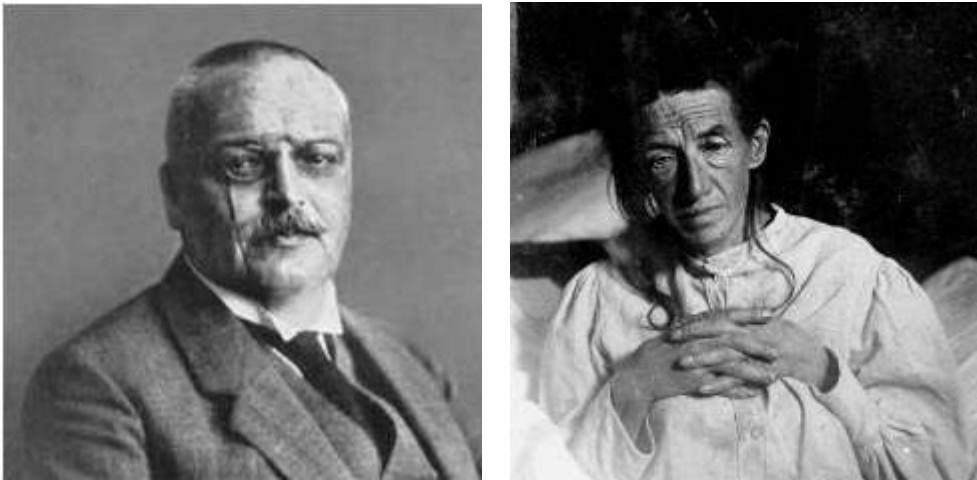


Figure 1 : Portrait du Dr Alzheimer et d'Auguste Dieter (*d'après Maurer et al., 1997*).

Il notera par exemple que Mme Dieter est incapable de se souvenir de la forme ou de la couleur d'objets posés devant elle quelques minutes auparavant, puis enlevés. Mme Dieter présentera encore d'autres signes de démence comme l'Amnésie de l'écriture, ou encore une expression orale marquée de déraillements paraphrastiques constants.

Par cet ensemble de désordres cognitifs, le Dr Alzheimer présenta le premier cas de cette pathologie en 1906 (qui par la suite prit son nom) dans son article « Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde » ou « une maladie grave du cortex à partir d'un processus particulier ». L'autopsie post-mortem du cerveau d'Auguste Dieter permet de décrire pour la première fois en 1911 la présence de deux marqueurs histologiques qui seront caractéristiques de la pathologie: les enchevêtrements neurofibrillaires et les plaques séniles.

2.3. Physiopathologie

2.3.1. Lésions tissulaires

D'un point de vue histologique, la (MA) se caractérise notamment par une atrophie de l'encéphale (Figure 2).

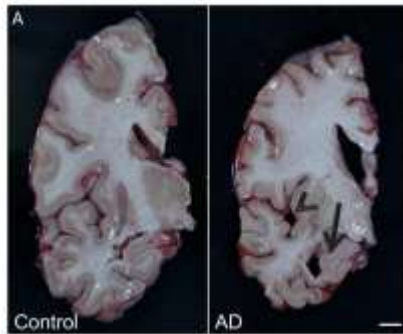


Figure 2: Mise en évidence de l'atrophie cérébrale chez les patients affectés par la MA versus patients sains.

Sont mis en évidence ici l'atrophie de l'hippocampe (flèche) et l'amincissement cortical (tête de flèche). Barre d'échelle: 1cm. D'après Crimins et al. 2013.

Au niveau tissulaire, les plaques séniles (composées de peptide β -Amyloïde ou A β) et les enchevêtrements neurofibrillaires ou NFT (composés d'agrégats de protéine tau hyperphosphorylée) sont retrouvés dans les zones lésées du cerveau (Figure 3).

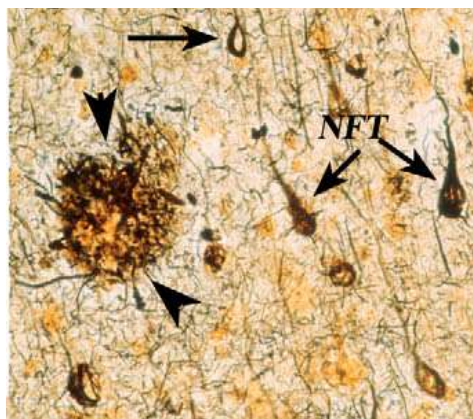


Figure 3: Mise en évidence des marqueurs histologiques de la MA.

On note la présence intracellulaire des NFT (flèches) et d'une plaque sénile (pointes de flèche). Barre d'échelle non indiquée. D'après Nixon, 2007.

Les travaux de Braak et Braak en 1991 ont permis d'établir l'évolution spatiale de la MA en 6 étapes, en identifiant les zones positives notamment aux NFT, car ces derniers suivent un modèle de distribution reproductible (Figure 4). Les étapes I et II correspondent aux premières atteintes de l'encéphale au niveau du cortex entorhinal et de l'hippocampe. Ces étapes ne sont pas seulement rencontrées dans le cas de la MA mais aussi chez des sujets sains. Aussi, ces étapes sont dites silencieuses et correspondent à des troubles cognitifs légers (Mild Cognitive Impairment). Les étapes III et IV montrent une avancée des lésions histologiques associées à la maladie d'Alzheimer qui gagnent alors les zones limbiques. Enfin, les étapes V et VI correspondent à l'atteinte des zones corticales. On parle alors d'Alzheimer pleinement développé (fully developed Alzheimer) où les troubles cognitifs sont à leur paroxysme.

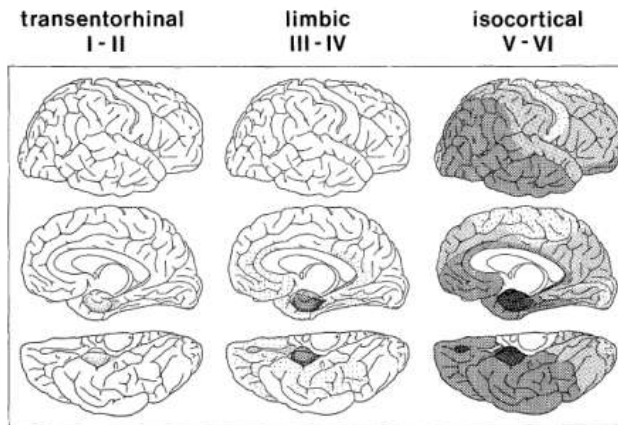


Figure 4 : Distribution spatiale des NFT en fonction de l'évolution de la MA.

Les NFT sont d'abord trouvés dans le cortex entorhinal, puis gagnent la région limbique, et se répandent enfin dans l'ensemble du cortex. Les nuances de gris montrent la densité pauvre (blanc) ou riche (noir) des NFT. D'après Braak & Braak, 1991.

Dans cette même étude, Braak et Braak ont établi un modèle de distribution spatiale des plaques séniles dans le cerveau de patients atteints de MA (Figure 5). Les dépôts amyloïdes initiaux se retrouvent dans les portions basales du cortex. Dans les stades plus avancés de la MA, les plaques gagnent les aires d'association isocorticales incluant notamment l'hippocampe, et se répandent ensuite dans l'ensemble du cortex. Néanmoins, la distribution des NFT dans le cerveau de patients malades semble être la plus reproductible et est encore utilisée à l'heure actuelle comme d'échelle d'évolution de la MA.

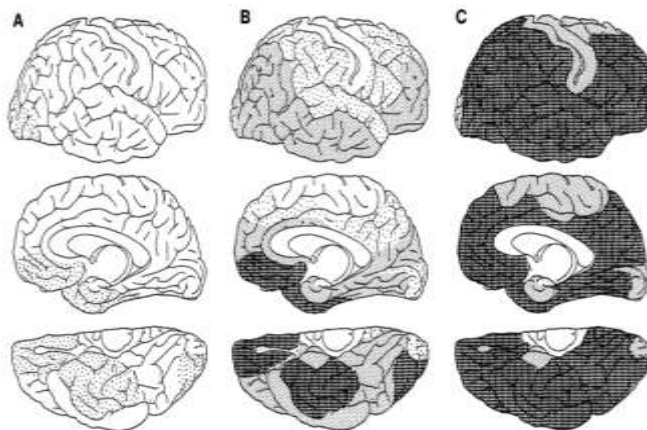


Figure 5 : Distribution spatiale des dépôts amyloïdes en fonction de l'évolution de la MA.

Les agrégats de peptide $A\beta$ sont d'abord trouvés dans les portions basales du cortex (A), puis gagnent les aires d'association corticales, notamment l'hippocampe, et se répandent enfin dans l'ensemble du cortex. Les nuances de gris montrent la densité pauvre (blanc) ou riche (noir) des plaques séniles. D'après Braak & Braak, 1991.

2.3.2. Les enchevêtrements neurofibrillaires

Les NFT sont des structures intracellulaires découvertes par le professeur Alzheimer lui-même. Mais il a fallu attendre le développement de la microscopie électronique pour caractériser leur structure (Kidd, 1963). Les NFT sont eux-mêmes constitués de segments enroulés entre eux pour former un ruban en vrille et portent le nom de filament appariés en hélice ou paired helical fragments (PHF, Figure 6, Wischik et al., 1985).

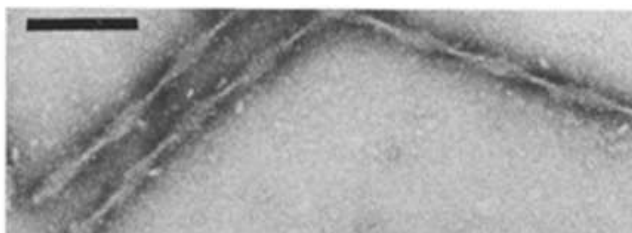


Figure 6: *PHF isolés à partir de cerveaux de patients atteints de MA.*

Structure des PHF vue en microscopie électronique par ombrage métallique au phosphotungstate de sodium. Barre d'échelle : 100 nm. D'après Wischik et al., 1985.

A partir des années 1980, plusieurs composants moléculaires des PHF furent identifiés parmi lesquels figurent l'ubiquitine (Mori et al., 1987), des constituants des filaments intermédiaires comme la vimentine (Yen et al., 1983; Miller et al., 1986). Mais c'est notamment la protéine d'association aux microtubules tau qui a été montrée comme composant essentiel des PHF (donc des NFT) et comme étant anormalement hyperphosphorylée. (Ihara et al., 1986; Kosik et al., 1986).

Il est important de noter que les NFT ne sont pas uniquement liés à la MA mais à d'autres pathologies neurodégénératives nommées Tauopathies, tel le syndrome de Down ou la démence fronto-temporale et parkinsonisme lié au chromosome 17 (FTDP-17). Mais contrairement à ces pathologies, aucune mutation de la protéine tau n'a été identifiée dans la MA (Shahani & Brandt, 2002), et ce malgré la corrélation entre dépôts de NFT et déficits cognitifs trouvés par Braak et Braak en 1991. La communauté scientifique s'est alors progressivement tournée vers l'hypothèse de la cascade amyloïde (Hardy et al., 1998; Hardy & Selkoe, 2002). Cette hypothèse stipule que non seulement les NFT ne seraient pas l'agent causatif des processus de neurodégénérescence, mais bel et bien une conséquence des propriétés toxiques du composant principal des plaques séniles: le peptide Béta-Amyloïde.

2.3.3. Les plaques séniles

Aussi appelées lésions amyloïdes, les plaques séniles sont essentiellement composées de peptide A β . Il a fallu attendre 1983 pour que ce peptide soit isolé à partir de cortex pré-frontaux de patients atteints de MA (Allsop et al., 1983). Cette découverte majeure est confirmée un an plus tard par Glenner et Wong (1984). Ces spécialistes montrent la même année que le peptide A β est également retrouvé dans le cortex de patients atteints du syndrome de Down (Glenner & Wong, 1984). Les NFT et les lésions amyloïdes ne sont donc pas des marqueurs histologiques spécifiques de la MA. Avant de se retrouver agrégé dans les plaques séniles sous forme de fibrille, l'A β une fois généré passe par différentes étapes d'agrégation.

2.3.4. Le peptide A β

2.3.4.1. Agrégation

Le peptide A β est constitué de 39 à 42 acides aminés et pèse environ 4,2 kDa. L'A β peut s'associer avec ses homologues et adopte ainsi différentes conformations. Les monomères s'agrègent en oligomères (A β o), puis en proto-fibrilles et en fibrilles, les principaux constituants des plaques amyloïdes (Figure 7).

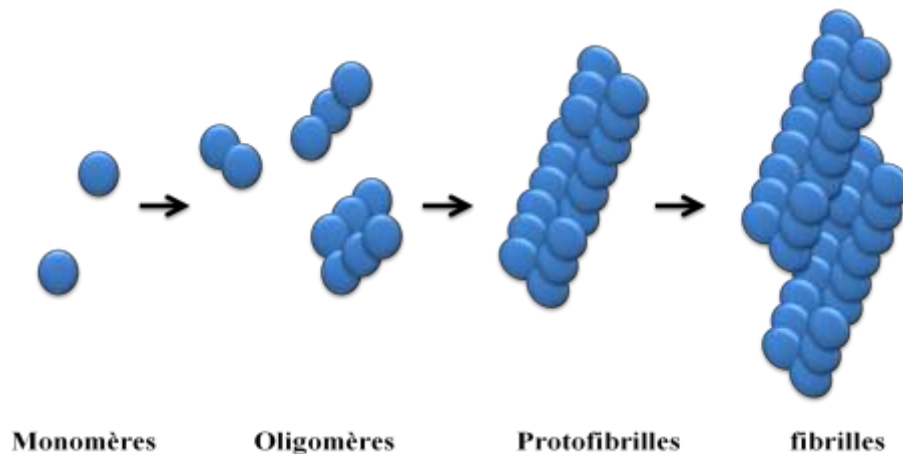


Figure 7 : *L'A β se retrouve sous plusieurs formes dans la MA : monomérique, oligomérique, protofibrillaire et fibrillaire.*

Le mode d'assemblage de l'A β o en fibrilles est encore très mal compris. L'hypothèse serait que les oligomères s'agrègent en proto-fibrilles pouvant soit dépolymériser vers des structures de plus bas poids moléculaire, soit polymériser en fibrilles de feuillets- β (revu par Haass & Selkoe, 2007). Expliquer ce mode d'agrégation est d'autant plus difficile que les oligomères possèdent plusieurs conformations connues et potentiellement impliquées dans la toxicité de l'A β . Un bon exemple est la découverte chez la souris Tg2576 par Lesne et collaborateurs en 2006, de la présence très enrichie d'A β oligomérique agrégé en dodécamères, nommé A β star 56 (Lesné et al., 2006). A partir d'A β o synthétique, une autre structure a été obtenue, en forme de donut de 12 nm de diamètre (Haas & Selkoe, 2007). D'autres études computationnelles ont montré qu'une autre espèce d'A β oligomérique, les globulomères sont des espèces vouées à rester solubles et à ne pas s'agréger en fibrilles (Yu & Zheng, 2011). Comprendre les changements conformationnels du monomère jusqu'à la fibrille reste donc un enjeu de taille. Néanmoins, la synthèse du peptide quant à elle est un processus bien caractérisé que nous allons maintenant aborder.

2.3.4.2. Synthèse

L'A β est issu de l'apprêtement de l'Amyloïd Precursor Protein ou APP, une protéine transmembranaire de masse moléculaire comprise entre 110 et 135 kDa. L'APP est exprimée à partir du gène *APP* situé sur le chromosome 21 chez l'humain. Il existe 3 isoformes majeures de l'APP: l'APP695, l'APP751, et l'APP770, nommées respectivement en fonction de la longueur de leurs chaînes peptidiques. Cette diversité est complétée par des modifications post-traductionnelles telles que des O et N-glycosylations, des sulfatations et des phosphorylations. Contrairement à APP695, les APP751 et 770 possèdent sur leur domaine extracellulaire un domaine inhibiteur de la Kunitz protease (KPI). APP695 (sans KPI) est surtout exprimée dans les neurones (Kang & Müller-Hill, 1990). Mais étonnement, il a été montré que les formes d'APP avec un domaine KPI sont davantage exprimées dans la MA (revu par Menéndez-González et al., 2006). De plus, l'activité prolongée des récepteurs glutamatergiques extrasynaptiques de type NMDA induit un « switch » d'expression d'APP, passant d'APP695 à APP avec domaine KPI, qui est associé avec une augmentation de la production d'A β (Bordji et al., 2010).

L'APP est synthétisée dans le réticulum endoplasmique, puis passe par le réseau *trans*-Golgi pour être adressée à la membrane plasmique. L'APP est ensuite clivée selon deux schémas différents. Le premier est la voie non-amyloïdogénique où l'APP est coupée en deux fragments résiduels : l'sAPP α et le peptide C83 (Figure 8). Ce clivage s'effectue au niveau de la membrane plasmique par une famille d'enzymes à activité α -sécrétase. Il s'agit de la famille des ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) dans laquelle on trouve ADAM 9, 10 et 17. Le rôle de l'APP et de ses produits de clivage reste encore assez mal compris, mais on prête à l'APP un rôle pro-trophique et une implication dans les processus de croissance axonale, de transports axonaux de cargos, et dans la formation des épines dendritiques (Revu par van der Kant & Goldstein, 2015).

L'autre voie de clivage de l'APP est la voie amyloïdogénique. Lorsque l'APP est adressée à la membrane, elle peut ensuite être ré-internalisée par voie endosomale où elle sera clivée par une enzyme à activité β -sécrétase: BACE1 (β -site APP cleaving enzyme 1) (Rajendran et al., 2006). Le clivage par BACE1 génère deux fragments: l'sAPP β et le peptide C99 (Figure 7). Le peptide C99 sera finalement clivé en A β par un complexe multi-enzymatique: la γ -sécrétase. Ce complexe est formé de 4 sous-unités protéiques: la préséniline 1 (PS1) ou 2 (PS2), la nicastrine, l'APH-1 (anterior pharynx-defective 1) et PEN-2 (preseniline enhancer-2). La γ -sécrétase achève le processus amyloïdogénique en clivant le peptide C99 au niveau de sa région transmembranaire, donnant naissance au peptide A β et au fragment AICD (APP IntraCellular Domain).

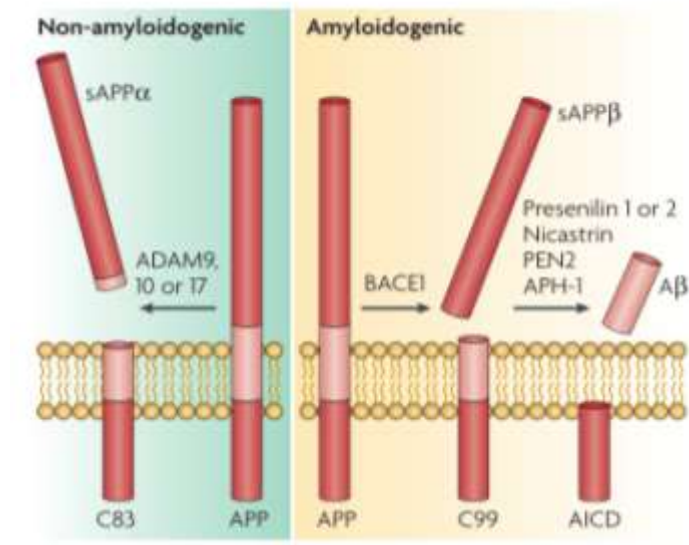


Figure 8 : Schéma simplifié de la maturation par protéolyse de l'APP par la voie amyloïdogénique et non-amyloïdogénique.

Schéma mécanistique montrant les deux voies du métabolisme de l'APP. Dans la voie non-amyloïdogénique, l' α -sécrétase clive l'APP à l'intérieur du domaine A β (rouge pâle) et génère ainsi l'sAPP α et le peptide C83. Dans la voie amyloïdogénique, l'APP se retrouve substrat de la β -sécrétase BACE1 qui clive l'APP en sAPP β et en peptide C99. Ce dernier est finalement clivé par le complexe γ -sécrétase à partir de son extrémité N-Terminale pour donner naissance à un peptide de 39 à 42 acides aminés : l'A β . D'après LaFerla et al., 2007.

Il est important de noter que la γ -sécrétase coupe le peptide C99 en N-terminal en segments de 39 à 42 acides aminés, comme l'A β ₁₋₄₀ ou l'A β ₁₋₄₂. L'A β ₁₋₄₂ est considéré comme l'isoforme la plus amyloïdogénique. Il est admis que les acides aminés 17 à 21 (Leu, Val, Phe, Phe, Ala) constituent une séquence hydrophobe essentielle pour l'aggrégation de l'A β (Hughes et al., 1996). La mutation des 2 résidus Phe, empêche l'aggrégation du peptide (Hughes et al., 1996). Par ailleurs, la différence de production entre A β ₁₋₄₂ et A β ₁₋₄₀ dans la MA est estimée à 10 contre 1 (Revu par van der Kant & Goldstein, 2015). D'autre part, une récente étude a démontré l'existence d'une protéolyse alternative de l'APP impliquant les métalloprotéases de la matrice extracellulaire liées à la membrane comme MT5-MMP. Ce processus aboutit à la formation de fragments plus ou moins longs nommés A η - α et A η - β , qui comme l'A β perturbent les processus mnésiques (Willem et al., 2015).

La localisation de l'APP, des complexes β et γ secrétase est toujours controversée. Par exemple, l'APP a également été vue dans les membranes lysosomales et mitochondriales (revu par LaFerla et al., 2007). Les produits de clivage protéolytique se retrouvent dans les surnageants de cellules en culture, dans le plasma et le liquide céphalorachidien (LCR). Il a également été montré que le fragment sAPP β pouvait être trouvé dans le LCR (Dobrowolska et al., 2014) ce qui suggère que l'sAPP β pourrait être clivé dans le réseau *trans*-Golgi puis sécrété. En conclusion, si les voies de clivage amyloïdogénique et non-amyloïdogénique de

l'APP sont bien connues, le ou les sites de localisation de l'APP, des complexes α , β , et γ -sécrétase sont encore mal compris.

Si la maturation de l'APP peut engendrer des processus cellulaires neurotrophiques ou neurodégénératifs si différents, on peut se questionner sur la nature de facteurs susceptibles d'influencer le métabolisme de l'APP.

2.4. Les facteurs de risques

La MA est une maladie multifactorielle incluant des paramètres génétiques ou environnementaux. Néanmoins l'âge de l'individu semble être très pondérant dans le développement de la MA. Elle peut se révéler être la cause de désordres cognitifs auparavant associés à l'âge (anciennement regroupés sous le terme de gâtisme), mais aussi la conséquence d'un ensemble conjugué de facteurs génétiques, sociétaux, intellectuels, biologiques et psychologiques.

2.4.1. Les facteurs héréditaires

2.4.1.1. ApoE et Bin-1

L'apoE ou apolipoprotéineE est une protéine sérique transporteuse d'acides gras. Le gène ApoE possède trois allèles : APO ϵ 2, APO ϵ 3 et APO ϵ 4. L'allèle APO ϵ 4 a été montré comme impliqué dans la MA. Le lien entre APO ϵ 4 et MA reste encore mal compris, mais l'allèle APO ϵ 4 est un facteur génétique augmentant le risque d'incidence de la MA de 3 fois pour les porteurs d'un allèle APO ϵ 4, et de 12 fois pour les porteurs des deux allèles APO ϵ 4 (Michaelson, 2014). Il est estimé que 60% de la population caucasienne atteinte de MA est porteuse d'un ou des deux allèles APO ϵ 4 (Michaelson, 2014). Une récente étude a montré chez des patients atteints de MA par APO ϵ 4 que leur LCR contenait moins de peptide A β que chez des patients sains, mais que ce dernier se présentait plus sous forme oligomérique, suggérant un lien entre APO ϵ 4 et A β oligomérique (Tai et al., 2014).

Bin-1 ou Bridging Integrator 1, parfois appelée amphiphysine2 est une protéine adaptatrice interagissant avec la machinerie moléculaire d'endocytose clathrine-dépendante. Plusieurs études génomiques associées ont montré la susceptibilité de Bin-1 comme facteur héréditaire de MA. Récemment, Holler et collaborateurs ont montré une distribution spatiale analogue entre Bin-1 et les NFT dans l'hippocampe et 5 régions corticales différentes de patients atteints de MA, mais sans lien avec les plaques séniles (Holler et al., 2014).

2.4.1.2. APP et PS-1

Comme nous l'avons vu précédemment, il n'existe pas de mutations associées à la protéine tau dans le cas de la MA. Il existe néanmoins des mutations autosomales dominantes situées sur les gènes APP, PS1 et PS2. Ces mutations sont responsables des formes familiales de la MA. Une mutation d'un de ces gènes affecte la production, le métabolisme et la stabilité

de l'A β . La découverte de ces mutations a permis l'élaboration de modèles murins de la MA par la technique de « Knock-In ». Une mutation très connue est la mutation dite « Arctic » où le glutamate en position 693 est remplacé par une glycine, ce qui conduit à une forme précoce et agressive de la maladie (Nilsberth et al., 2001). Une autre mutation de l'APP est la mutation dite « Swedish » où la lysine et la méthionine en position 670/671 sont remplacées par l'asparagine et la leucine, ce qui augmente l'affinité de l'APP envers BACE1. Mais la mutation la plus agressive est sans doute la mutation apparaissant sur la PS1, où la leucine en position 166 est remplacée par une proline, ce qui induit la plus forte production d'A β 42, comparée à toutes les autres formes autosomales de la maladie (Moehlmann et al., 2002). La plus lourde des conséquences chez les individus porteurs de cette mutation est l'apparition de la MA avant l'âge de 30 ans, voire à l'adolescence.

En 2006, Rebecca Radde et collaborateurs ont mis au point la lignée de souris transgénique APP KM670/671NL + PS1-L166P, une lignée humanisée sur fond génétique connu de C57BL/6J, possédant ainsi la mutation Arctic de l'APP et la mutation L166P de la PS1 (Radde et al., 2006). Cette lignée est considérée comme l'un des meilleurs modèles murins de la MA, et sera le premier objet de notre étude. Bien que les formes autosomales de la MA se déclarent plus tôt chez les patients, et soient considérées comme parmi les formes les plus agressives, elles ne représentent que moins de 2% de tous les cas de MA. La grande majorité met en causes de multiples facteurs environnementaux dont certains restent encore inconnus à ce jour.

2.4.2. Les facteurs environnementaux

Pour de multiples pathologies, il est maintenant évident que l'hygiène de vie est un facteur prépondérant dans l'apparition/l'évolution de maladies, y compris la maladie d'Alzheimer. De ce fait, l'alimentation et les troubles métaboliques ont un impact sur l'apparition de la MA. Un régime alimentaire riche en graisses saturées, glucides simples et en sel peut engendrer obésité, diabète et hypertension. Ces syndromes peuvent s'accompagner d'un syndrome inflammatoire et augmentent l'incidence de la MA. La consommation d'alcool et de tabac sont eux aussi des comportements pro-oxydants et sont susceptibles d'augmenter le vieillissement cellulaire et donc le taux d'apparition de la MA. Les polluants environnementaux comme certains métaux neurotoxiques (Plomb, Mercure, Aluminium, Cadmium...) ou encore les pesticides peuvent induire une augmentation de la production d'A β et de la phosphorylation de Tau (revu par Chin-Chan et al., 2015). Dans un autre contexte, un environnement socio-culturel appauvri/défavorisé peut augmenter le risque d'incidence de la MA.

2.4.3. Les facteurs protecteurs

Il existe certains allèles ayant des effets neuro-protecteurs. C'est le cas de l'allèle APO ϵ 2 qui contrairement à son homologue APO ϵ 4 a été montré comme neuroprotecteur dans les phases pré-mortem de la maladie (Corder et al., 1994). Un autre allèle de l'APP: l'APP

A673T, allèle d'incidence rare, retrouvé notamment chez la population suédoise, joue un rôle neuroprotecteur (Jonsson et al., 2012; Kero et al., 2013). L'hypothèse émise est que la proximité de la mutation de l'APP avec son domaine de clivage par BACE-1 perturbe d'une manière encore inconnue la protéolyse amyloïdogénique d'APP par BACE-1.

Si les mauvaises habitudes alimentaires peuvent jouer un rôle sur l'incidence de la MA, la consommation d'aliments riches en anti-oxydants (fruits, légumes, thé...) et un environnement enrichi sont possiblement autant de facteurs susceptibles de retarder et/ou de diminuer l'apparition de la MA. Les facteurs pro et anti neurodégénératifs ont été clairement mis en évidence ces 20 dernières années même si d'autres restent encore à découvrir. Pendant ce même laps de temps, un autre champ de recherche a été très particulièrement examiné: la synaptotoxicité de l'A β .

2.5. A β et synaptotoxicité

Les plaques séniles, constituées de fibrilles d'A β , ont longtemps été considérées comme l'agent causatif des phénomènes de neurodégénérescence rencontrés dans la MA (Hardy & Higgins, 1992). Mais elles furent par la suite montrées comme non-corrélabiles avec la mort neuronale et les déficits cognitifs (revu par Haass & Selkoe, 2007). Au contraire, il est maintenant évident que les oligomères d'A β sont les espèces responsables des perturbations cognitives. Après la découverte de l'A β dans les plaques, ce dernier a été retrouvé à l'intérieur des neurones (Grundke-Iqbal et al., 1989). L'A β a fait l'objet d'une récente étude confirmant une disparition des connexions inter-neuronales, sur culture primaire de neurones traités au peptide A β (Umeda et al., 2015).

Il est donc maintenant admis que l'A β une fois produit s'accumule dans le neurone, et que ce phénomène précède l'apparition des plaques. En revanche, son origine est toujours controversée : provient-il d'une maturation finale de l'APP se trouvant sur des organites comme les mitochondries ? Ou est-il en réalité de l'A β extracellulaire ayant été incorporé dans le milieu intracellulaire ? Il semblerait que les deux processus se produisent, mais que néanmoins, la vaste majorité de l'A β produit soit sécrétée dans le milieu extracellulaire (voir pour revue LaFerla et al., 2007) à partir d'APP situé dans la membrane plasmique. Son internalisation et ses effets inhérents sont régulés par des récepteurs et transporteurs transmembranaires (voir Tableau 1).

| Récepteur-transporteur pouvant fixer l'Aβ | Effet | Références |
|--|--|---|
| Récepteur nicotinique α7nAChr | Internalisation du récepteur et accumulation d'Aβ dans le neurone | Wang et al., 2000 |
| Récepteur associé aux lipoprotéine de faible densité (LRP1) | Se lie au récepteur ou à son ligand ApoE, provoque l'endocytose de LRP1 et l'accumulation d'Aβ | Bu et al., 2006 ; Fuentealba et al., 2010 |
| Récepteur de la protéine du Prion (PrP^c) | Se fixe à PrP ^c au niveau des radeaux lipidiques et active la Src kinase Fyn | Um et al., 2013; Rushworth et al., 2013 |
| Intégrines de type αv | Se fixe aux intégrines et induit une inhibition de la LTP | Wang et al., 2008 |
| Intégrines de type α5β1 | Se fixe au récepteur, qui est ensuite internalisé puis dégradé | Matter et al., 1998 |
| Récepteur NMDA | Se fixe au récepteur et induit son endocytose | Snyder et al., 2005 |
| Récepteur AMPA | Se fixe au récepteur AMPA et induit son endocytose par voie calcineurine-dépendante | Zhao et al., 2010 |
| Récepteur GABA | Se fixe au récepteur et induit son inhibition | Ulrich, D., 2015 |
| Récepteur à produits terminaux avancés de glycation (RAGE) | Se fixe au récepteur, induit son internalisation active de la voie NF-κB, ce qui transporte ensuite l'Aβ au travers de la barrière hémato-encéphalique | Kim et al., 2013 |

Tableau 1 : Liste non-exhaustive des récepteurs putatifs de l'Aβ et leurs effets.

Comme nous venons de le voir, l'Aβ est un ligand potentiel pour un large spectre de récepteurs transmembranaires dont certains induisent son internalisation dans le milieu intracellulaire. Cet engouement pour l'interaction de l'Aβ avec des possibles récepteurs provient notamment des travaux de Lambert et collaborateurs en 1998, où l'Aβo appelé dans l'étude Aβ-derived-diffusible-ligands induit une mort neuronale. Ces travaux prouvent le caractère neurotoxique de l'Aβ. Quatre ans plus tard, Walsh et collaborateur en 2002 (Walsh et al., 2002) montrent que ces mêmes oligomères d'Aβ inhibent le processus de LTP (Long Term Potentiation). Le processus de LTP est comme nous le verrons au chapitre 2, le corrélat électrophysiologique d'induction de mémoire au niveau cellulaire. Les résultats de Walsh ont donc inscrit deux informations capitales. Tout d'abord, l'Aβ possède une cible privilégiée : la synapse, domaine sub-micrométrique neuronal où a lieu la neurotransmission. Mais surtout, l'Aβ devient alors un acteur très suspecté de participer à la perturbation/inhibition des processus cellulaires et moléculaires de mémorisation à la synapse. Ceci expliquerait les désordres cognitifs rencontrés dans la MA, qui rappelons-le, ne corrélaient pas avec l'évolution des plaques séniles, pourtant composées de peptide Aβ. Nous allons donc maintenant nous tourner vers la synapse et développerons les processus mnésiques qui y ont lieu. Puis nous nous pencherons sur l'atteinte de ces processus par le peptide Aβ.

Chapitre 2 : La Synapse

Le cerveau est composé d'environ 100 milliards de neurones. Chacun d'entre eux communique avec ses homologues au travers de domaines sub-micrométriques spécifiques: les synapses. Les synapses permettent de stocker l'information et en même temps d'accueillir de nouvelles données. Un seul neurone peut établir jusqu'à 100 000 synapses, ce qui explique la complexité du réseau neuronal, différente pour chaque individu.

1. La synapse

L'influx nerveux ou potentiel d'action est un mouvement d'ions relayé de neurone en neurone par les synapses qui constituent la voie privilégiée de communication inter-neuronale. Une synapse se compose d'un compartiment pré et post-synaptique qui sont séparés par la fente synaptique (Figure 9). Le compartiment pré-synaptique est constitué du bouton axonal du neurone émetteur alors que le post-synaptique est situé dans une structure spécialisée située sur la dendrite ou le corps cellulaire du neurone receveur. Le processus de neurotransmission peut se dérouler de différentes façons à travers différentes configurations synaptiques auxquelles nous allons maintenant nous intéresser.

1.1. Les différents types de synapses

1.1.1. La synapse électrique

La synapse électrique se caractérise par une liaison étroite entre compartiment pré et post-synaptique. Le relai de l'influx nerveux se fait dans ce cas directement au travers de jonctions serrées. Ces jonctions sont constituées d'un anneau de connexines, formant un canal aqueux et perméable aux ions ce qui permet la synchronisation du signal. Mais ce type de synapse est minoritaire au sein du système nerveux central.

1.1.2. La synapse chimique

Plus complexe que la synapse électrique, la synapse chimique fait appel à des neurotransmetteurs pour propager l'influx nerveux. Lorsque le potentiel d'action arrive au bouton axonal, il induit la fusion de vésicules à neurotransmetteurs au niveau de la membrane pré-synaptique, qui se retrouvent alors dans la fente synaptique. La fixation du neurotransmetteur à son récepteur (notamment de nature récepteur-canal) au niveau de la post-synapse (Figure 9) provoque l'ouverture des canaux ioniques et assure ainsi le relai du signal.

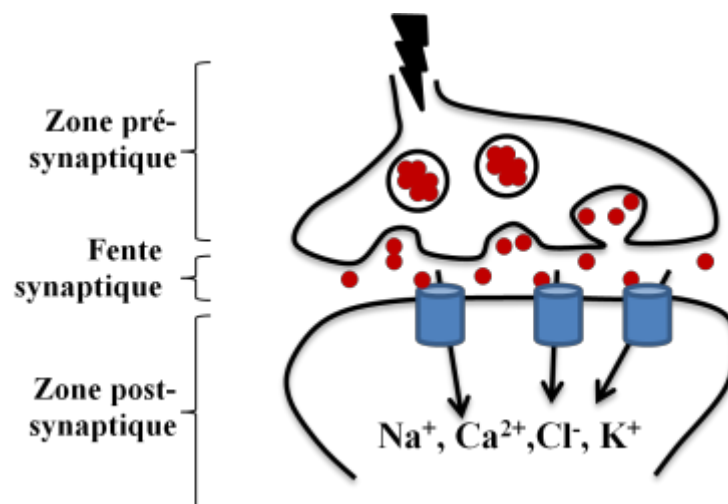


Figure 9 : La synapse chimique.

Schéma simplifié d'une synapse chimique. Lors de la neurotransmission, l'influx nerveux (éclair noir) parvient jusqu'au bouton axonal et provoque l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants. L'influx de calcium induit la fusion de vésicules à neurotransmetteurs avec la membrane pré-synaptique (billes rouges cerclées en noir). Le neurotransmetteur (bille rouge) alors libéré dans la fente synaptique se fixe à son récepteur (cylindre bleu) post-synaptique et induit l'ouverture des canaux, perméables aux ions. L'influx de cations (Na^+ , K^+ et Ca^{2+}) provoque une dépolarisation membranaire alors que le Cl^- l'hyperpolarise.

Le neurotransmetteur peut être par exemple un polypeptide, un gaz ou encore un acide aminé (Tableau 2). La liaison à son récepteur post-synaptique est susceptible de générer un potentiel post-synaptique soit inhibiteur (PPSI), soit excitateur (PPSE), ce qui favorise ou non le déclenchement d'un potentiel d'action. Les effets excitateurs induisent notamment l'entrée de sodium et de calcium alors que les effets inhibiteurs induisent l'entrée de chlore.

| Neurotransmetteur | Effet post-synaptique majeur |
|--|------------------------------|
| Glutamate | Excitateur |
| Acétylcholine | Excitateur |
| Catécholamines (dopamine, adrénaline...) | Excitateur |
| Histamine | Excitateur |
| Adénosine triphosphate (ATP) | Excitateur |
| Acide γ-aminobutyrique (GABA) | Inhibiteur |
| Glycine | Inhibiteur |
| Neuropeptides | Excitateur et Inhibiteur |
| Monoxyde d'azote (NO) | Excitateur et inhibiteur |

Tableau 2 : Liste non-exhaustive des principaux neurotransmetteurs et leur effet post-synaptique majeur.

Les synapses excitatrices glutamatergiques représentent la majeure partie de la neurotransmission excitatrice du Système Nerveux Central (SNC) et sont très abondantes dans le cortex et l'hippocampe. Les synapses inhibitrices se retrouvent essentiellement sur le corps

cellulaire du neurone (soma) ou directement sur la dendrite alors que les synapses excitatrices forment contact le long de l'arborescence dendritique au travers des épines dendritiques. Définissant l'espace post-synaptique, les épines dendritiques sont localisées sur les dendrites et constituent des domaines sub-micrométriques très spécialisés que nous allons maintenant décrire.

1.2. L'épine dendritique

1.2.1. Historique

Les épines dendritiques constituent le compartiment post-synaptique receveur de l'influx nerveux des synapses excitatrices glutamatergiques. Les épines ont été découvertes par Ramòn y Cajal en 1888. Ce dernier remarqua la présence de protrusions membranaires le long de l'arborescence dendritique du neurone (Figure 10).

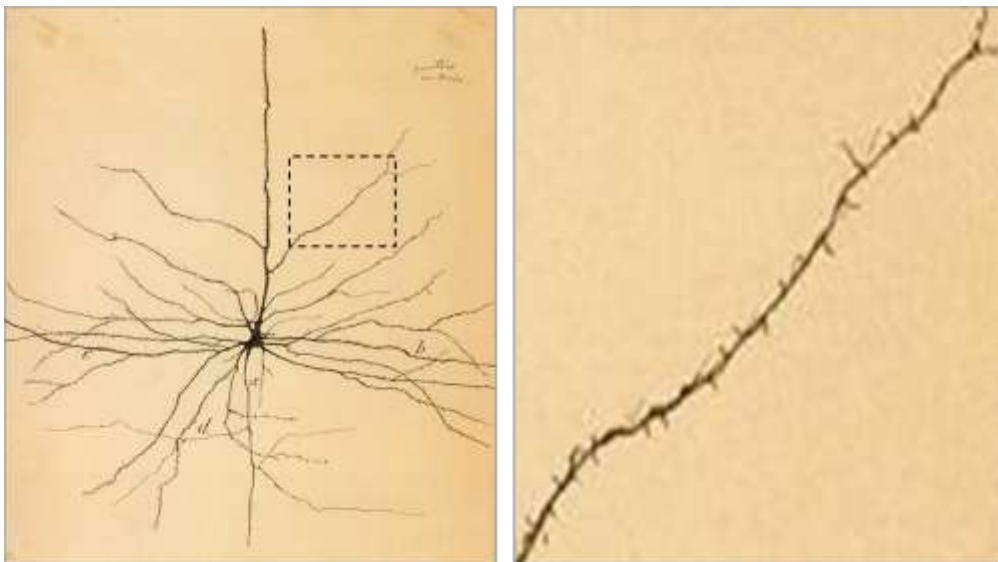


Figure 10: *Dessin oriignal de Ramòn y Cajal.*

Neurone coloré par imprégnation argentique (gauche). Vue agrandie d'un segment dendritique où sont visibles des épines dendritique (droite).

Ces protrusions prirent par la suite le nom d'épines dendritiques. Il a fallu attendre le développement de la microscopie électronique avant d'en connaître davantage sur leur structure. En 1959, Georges Gray montra pour la première fois un contact en amont de l'épine dendritique par le bouton axonal (Figure 11). Après observation, Gray les distingua en deux catégories. Les synapses symétriques qui présentent deux zones denses aux électrons en pré et post-synaptique, mais qui sont de même épaisseur (Guillery, R.W., 2000). Elles sont connues pour être caractéristiques des synapses inhibitrices. Les synapses asymétriques en revanche présentent une zone dense aux électrons plus épaisse du côté post-synaptique et correspondent à des synapses excitatrices pour la majorité.

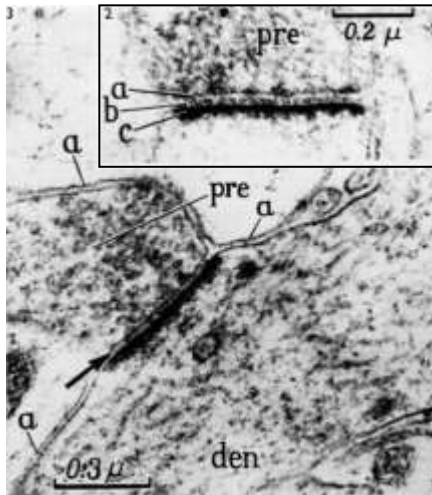


Figure 11 : l'épaisseur de la densité pré vs post-synaptique est un premier paramètre dans la distinction des différentes synapses

Électronographie de synapses asymétriques. « a » désigne la zone pré-synaptique dense aux électrons (sup) et des membranes péri-synaptiques non épaissies (inf). « b » désigne le matériel dense dans la fente synaptique et « c » montre l'épaississement post-synaptique. Pre= pré-synaptique ; den= dendrite. Adapté de Guillery, 2000 et adapté de Gray, 1959.

1.2.2. Morphologie des épines dendritiques

Les épines dendritiques sont des domaines sub-micrométriques extrêmement spécialisés et dynamiques. Leur forme évolue sans cesse grâce à un cytosquelette d'actine filamenteuse (Actine-F) particulièrement riche (Landis & Reese, 1983) et extrêmement dynamique (Star et al., 2002), qui permet des changements de forme drastiques, en l'espace de quelques secondes. La force synaptique, c'est-à-dire l'intensité avec laquelle une épine va répondre pour un stimulus donné, varie également et proportionnellement aux changements morphologiques. Ces phénomènes ont lieu pendant les processus dits de plasticité synaptique et feront l'objet d'une étude approfondie plus loin dans ce chapitre. Les épines dendritiques ont été étudiées dans de nombreuses espèces notamment de mammifères et sur de nombreux types neuronaux (cellules de Purkinje, cellules pyramidales du cortex et de l'hippocampe...). Leur densité varie de 1 à 10 par micromètre de dendrite et leur longueur est comprise entre 0,2 et 2 μm.

Une épine dendritique est typiquement décrite comme une protrusion membranaire pointant d'une dendrite, caractérisée par une tête bulbeuse, un cou étroit et la présence d'une zone riche en protéines et dense aux électrons : la densité post-synaptique ou PSD pour Post Synaptic Density (Figure 12).

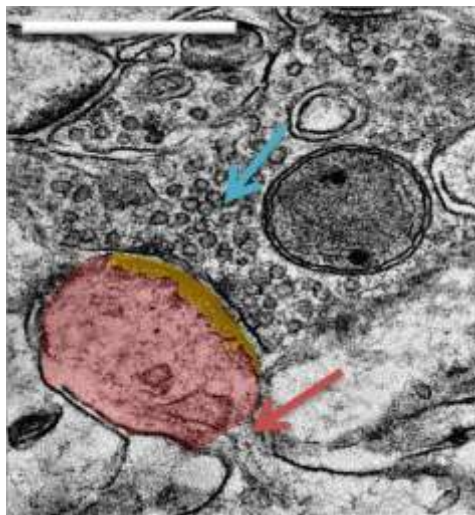


Figure 12: L'épine dendritique.

Électronographie d'une synapse asymétrique de la région CA1 de l'hippocampe chez la souris. Sont mis en évidence la présence d'un cou (flèche rouge), d'une tête distincte et lobée (zone rouge) et de la densité post-synaptique (zone jaune), distinctifs d'une épine dendritique. L'épine fait face à l'élément pré-synaptique où l'on distingue les vésicules chargées en neurotransmetteur (flèche bleue). Barre d'échelle : 500 nm.

Une troisième composante dans la régulation de la neurotransmission et des phénomènes de plasticité est l'intervention de cellules astrocytaires de par et d'autre de la synapse. Elles entourent cette dernière au travers de ramifications membranaires nommées prolongements astrocytaires. On parle alors de synapse tripartite (Figure 13). Ces prolongements interviennent et modulent l'activité synaptique par la libération de messagers comme le glutamate, l'adénosine tri-phosphate ou ATP, ou encore le GABA ou acide γ -aminobutyrique au niveau de la fente synaptique. Ce processus appelé gliotransmission intervient dans la modulation de la neurotransmission et dans les processus de plasticité synaptique (Perea et al., 2009).

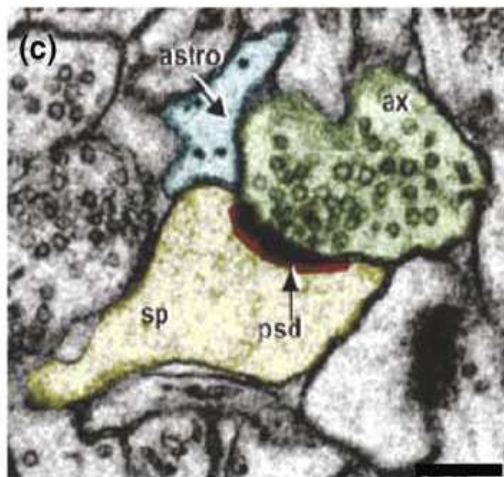


Figure 13: Electronographie d'une synapse tripartite.

Sont mis en évidence l'épine dendritique (sp/ zone jaune) avec la densité post-synaptique (psd), le bouton axonal (ax/zone verte) et un prolongement astrocytaire (astro/zone bleue). Barre d'échelle : 500 nm. Adapté de Witcher et al., 2007.

La morphologie des épines est très hétérogène. Les épines dendritiques se présentent sous une multitude d'aspects, sur un même neurone, une même dendrite, et même entre épines voisines (Harris & Kater, 1994; Sorra & Harris, 2000; Harris, 2008, figure 14). Ce spectre est si large que deux épines sur une même dendrite peuvent différer de 10 à 50 fois dans leurs dimensions (Sorra & Harris, 2000; Harris, 2008).

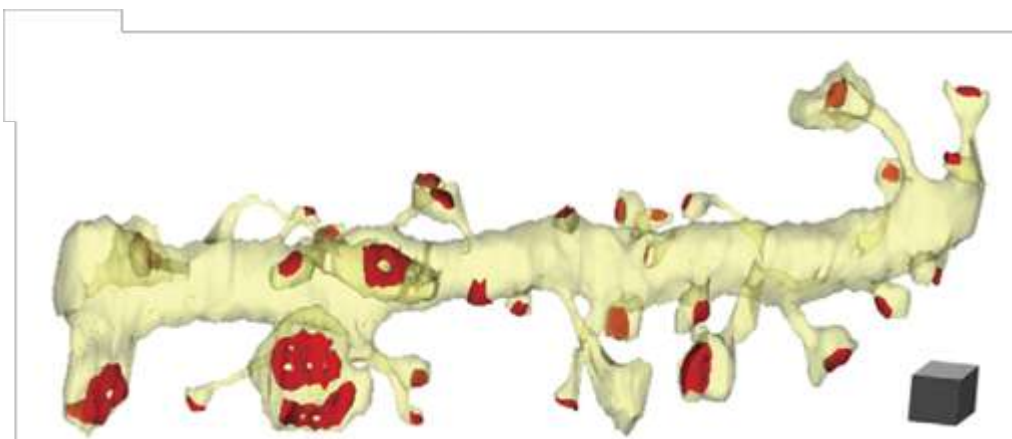


Figure 14: L'hétérogénéité des formes d'épines se retrouve au sein d'une même dendrite.

Reconstruction 3D d'électronographies séries d'une dendrite (jaune) montrant l'éventail de formes d'épines et de la PSD (rouge) sur seulement 8,5 μ m de dendrite. Cube d'échelle : 0.5 μ m³. D'après Bourne & Harris, 2007.

Plusieurs formes caractéristiques des épines sont retrouvées. De ce fait, les épines dendritiques ont été classées par Peters et Kaiserman-Abramof (1970) en fonction des morphotypes les plus retrouvés. Ce classement sera repris plus tard par Harris et collaborateurs en 1992 (Figure 15). De par le large spectre de formes et de dimensions des épines, certaines études très récentes se basent encore sur des paramètres morphologiques arbitraires et non chiffrés (Luczynski et al., 2015) pour établir une classification morphologique des épines. Bien que cette classification soit aisée et très pratique, il faut garder à l'esprit que les épines pour la plupart ne restent pas figées dans une sous-catégorie mais sont l'objet d'un continuum de remodelages morphologiques. En revanche, il existe une relation structurale étroite entre les dimensions de la PSD et le volume de l'épine, qui évoluent tous les deux de concert, et proportionnellement (Harris et al., 1992 ; Spacek and Harris, 1997 ; Harris, 2008).

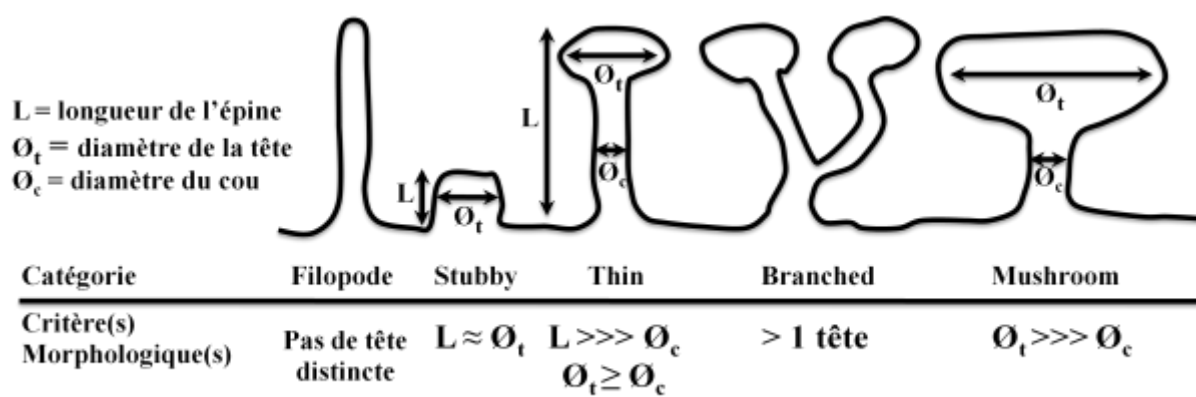


Figure 15: Morphotypes d'épines retrouvés notamment dans le cortex et l'hippocampe et leurs critères morphologiques respectifs.

Représentation schématique des principaux types d'épines dendritiques et leurs paramètres morphologiques. Les filopodes se distinguent par l'absence de tête. Les « stubby » (talons) ne présentent pas de cou et leur longueur est équivalente au diamètre de la tête. Les « thin » (fines) ont une tête et un cou définis, et ont une longueur et un diamètre de tête supérieurs au diamètre du cou. Les « branched » (branchées) montrent deux têtes distinctes se partageant un même cou. Enfin, les « Mushroom » (champignons) se distinguent par leur tête bulbeuse très développée et de diamètre bien supérieur à celui du cou. Inspiré de Harris et al., 1992.

1.2.2.1. Les épines « filopodes »

Les épines de type filopode sont caractérisées par un cou très long et l'absence d'une tête définie au sommet de l'épine. Ce sont en réalité des épines immatures, sans contact pré-synaptique, et qui recherchent un bouton axonal dans leur environnement. Elles se retrouvent donc davantage dans le système nerveux immature (Bourne and Harris, 2007). Bon nombre d'études morphologiques des épines ne les incluent pas dans leur classification, car elles ne

correspondent pas aux critères caractéristiques des épines (pas de tête définie, pas de PSD et/ou pas de contact pré-synaptique).

1.2.2.2. Les épines « stubby »

Les épines « stubby », en forme de talon, correspondent à des formes intermédiaires d'épines en cours de formation. Elles sont également considérées comme un contact axo-dendritique. Elles n'ont pas de forme mature car il n'est pas possible d'observer de cou distinct à leur base. Leur longueur est environ égale au diamètre de la tête.

1.2.2.3. Les épines « thin »

Les épines « thin » ou fines représentent la plus grande part d'épines dendritiques rencontrées dans l'hippocampe et le cortex chez l'adulte (Harris et al., 1992). Elles sont particulièrement dynamiques et montrent le plus de changements morphologiques spontanés. Elles présentent des caractéristiques morphologiques distinctives: elles possèdent un cou bien défini, de longueur supérieure au diamètre du cou, ainsi qu'une tête distincte faisant face au bouton axonal et de largeur supérieure ou égale à celle du cou. La dynamique de ces épines leur permet de maintenir une excellente flexibilité structurale. Elles peuvent ainsi se stabiliser, s'élargir, se rétracter ou disparaître. Ces changements de forme sont associés aux changements de neurotransmission en pré-synaptique, et permettent aux épines d'adapter leur forme face à un stimulus augmenté ou diminué. Ainsi, de par leur nature plastique, les épines « thin » sont aussi appelées épines en cours d'apprentissage ou « learning spines » (Harris and Kater, 1994; Bourne & Harris, 2007).

1.2.2.4. Les épines « branched »

Les épines « branched » ou branchées se distinguent par la présence de deux têtes bien distinctes se partageant un seul et même cou. Seulement 10% des épines en moyenne sont de type branché (Harris & Stevens, 1988). Elles ont fait et font toujours l'objet de controverses vis-à-vis de leur origine. Comme nous le verrons plus loin, on ne sait toujours pas si elles proviennent d'un processus de dédoublement synaptique, d'un filopode faisant contact avec un bouton axonal déjà en lien avec une autre épine ou d'un rapprochement de deux synapses voisines (Hering and Sheng, 2001; Fiala et al., 2002).

1.2.2.5. Les épines « mushroom »

Les épines « mushroom » ou champignon représentent environ 25% des épines du SNC (Bourne & Harris, 2007). Elles sont clairement caractéristiques des épines dites matures de par leur cou étroit, leur tête bulbeuse bien définie et de diamètre bien supérieur à celui du cou et d'au moins 0,6 μm (Sorra & Harris, 2000 ; Bourne & Harris, 2007). Elles présentent la plus forte concentration en éléments de la PSD. Les épines « Mushroom » représentent le morphotype des épines matures/actives. Aussi, elles prennent parfois le nom d'épines

mémoire. Si une épine mémoire constitue le stade avancé d'une épine, quel sont les mécanismes morphologiques qui conduisent un filopode à devenir une épine mature ?

1.2.3. Morphogénèse des épines dendritiques

Les épines dendritiques apparaissent tôt durant le développement post-natal, après formation des neurites. Leur processus de formation ou spinogénèse ne fait pas encore l'objet d'un consensus au sein de la communauté neuroscientifique. Il existe à l'heure actuelle 3 modèles de développement des épines (Figure 16).

Le plus ancien (étudié sur des neurones pyramidaux) propose que la formation de l'épine soit engendrée par le bouton axonal qui vient tout d'abord faire contact sur la dendrite. Puis le segment post-synaptique dendritique croît et se transforme en épine (Miller & Peters, 1981). Le second modèle provient d'une étude réalisée sur des cellules de Purkinje par Sotelo en 1990. L'hypothèse expliquée est que la spinogénèse se produit indépendamment du bouton axonal. Les épines émergeraient de la dendrite et matureraient sans contact axonal. Le dernier modèle (étudié sur neurones pyramidaux) implique les filopodes comme candidats précurseurs des épines. Les filopodes ou proto-épines, comme les nomment Dailey et Smith dans leur étude, émergeraient depuis la dendrite. Ils viendraient ensuite se connecter à un axone voisin et matureraient en épines (Dailey & Smith, 1996). Les travaux d'optogénétique et d'ultrastructure de Korobova et Svitkina semblent soutenir cette théorie, ainsi que les travaux mécanistiques d'Hotulainen et collaborateurs (Hotulainen et al., 2009; Korobova and Svitkina, 2010).

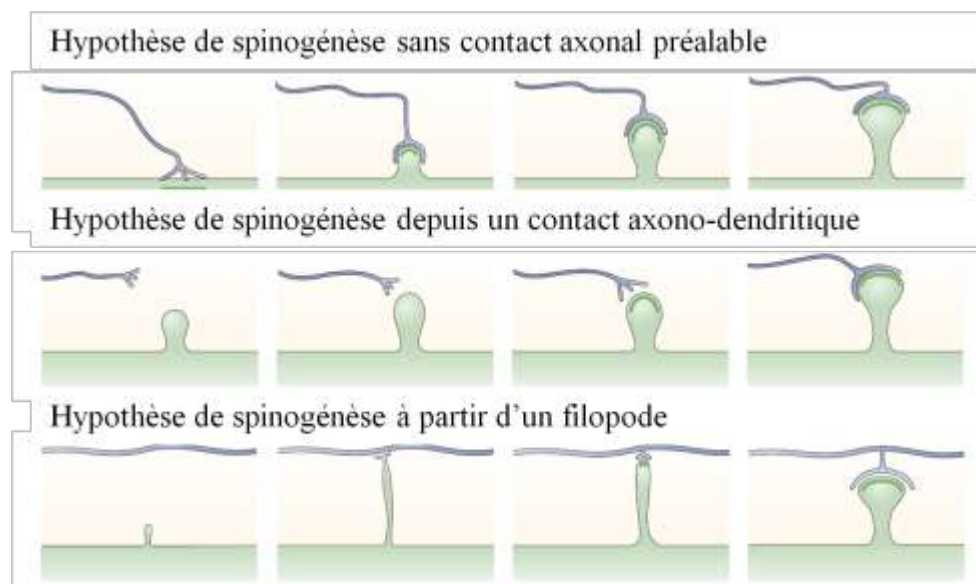


Figure 16 : Les 3 grands modèles de spinogénèse.

Schéma mécanistique des 3 hypothèses de formation des épines dendritiques. L'épine se forme de manière indépendante (haut), ou bien à partir d'une synapse établie depuis le shaft (milieu) ou encore par le biais d'un filopode (bas) qui une fois connecté à l'axone, mature en épine. Adapté de Yuste and Bonhoeffer, 2004.

Les propriétés extrêmement dynamiques des épines nous montrent également dans le processus de spinogénèse la grande variété de phénomènes morphologiques observés sur ces domaines sub-micrométriques. Nous allons à présent nous pencher sur deux autres cas spéciaux : les épines perforées et les spinules.

1.2.4. Un cas particulier, les spinules et synapses perforées

1.2.4.1. Descriptif

Lorsque l'ultrastructure des synapses a été révélée par la microscopie électronique, Westrum et Blackstad ont montré en 1962 la présence d'invaginations membranaires, sortant notamment de l'épine et pointant vers le bouton axonal où elles y seraient endocytées (Westrum and Blackstad, 1962). Ces structures ont été nommées « complexe spinule » puis « spinule synaptique » et « spinule ». Ce phénomène a ensuite été remarqué dans d'autres types cellulaires comme la lignée 3T3 de fibroblastes (Marston et al., 2003). C'est pourquoi vers la fin des années 1990, ce phénomène pris le nom plus généraliste de « trans-endocytose », dans lequel la membrane plasmique d'une cellule efférente va s'évaginer en direction d'une cellule voisine qui endocytera ce cargo membranaire.

Les spinules sont peu étudiées (environ 30 publications depuis leur découverte en 1962). Ils ont longtemps été considérés comme un phénomène artéfactuel car vers 1980, différentes études pointaient du doigt la possible altération morphologique des synapses par la fixation aux aldéhydes (Deutsch and Hillman, 1977). Leur étude s'est poursuivie entre-temps, mais c'est principalement l'étude de Tao-Cheng et collaborateurs en 2009 qui permet de démontrer la présence de spinules à partir de tissus fixés soit par l'ajout d'aldéhydes, de tétroxyde d'osmium, soit par le froid (Tao-Cheng et al., 2009).

D'un point de vue structural, un spinule se caractérise par une protubérance de la membrane plasmique de l'épine, qui vient pointer et s'insérer dans le compartiment pré-synaptique. Un spinule présente une forme relativement tubulaire et se distingue des organelles par la présence d'une double membrane plasmique (Figure 17). La membrane interne provient du domaine post-synaptique alors que la membrane externe provient du bouton axonal. La longueur des spinules est variable : de quelques dizaines à plusieurs centaines de nanomètres. Leur diamètre externe fluctue également de 27 à 150 nm (Spacek and Harris, 2004). Ils sont peu denses aux électrons et ne contiennent généralement pas d'éléments de la PSD (confirmé par les travaux de cryofracture de Bozhilova-Pastirova & Ovtscharoff, 1999). Ils ne contiennent pas sinon peu de vésicules. Certains présentent également un manteau de clathrine à leur extrémité pré-synaptique, caractéristique d'une endocytose clathrine-dépendante (Figure 17). Les membranes internes/post-synaptiques et externes/pré-synaptiques sont sensiblement parallèles le long du spinule, ce qui suggère une interaction physique entre protéines trans-membranaires des deux bi-couches. La synthèse d'un spinule est certainement actine-dépendante, car c'est le cytosquelette le plus abondant de l'épine et que la formation de spinules peut être inhibée par traitement à la cytochalasine, un inhibiteur pharmacologique de polymérisation de l'actine (De Juan & Garcia, 1998).

Soixante-deux pourcents des spinules sont retrouvés sur la tête des épines dendritiques (Spacek and Harris, 2004), la plupart des épines en question étant de type « mushroom ». Le reste provient de dendrites, d'axones ou même de cous. La majorité des spinules synaptiques pointent vers le bouton axonal (Spacek and Harris, 2004). De par la nature très labile des spinules (disparition en 1 min sous certaines conditions, Tao-Cheng et al., 2009) et la nécessité de fixer le tissu pour la microscopie électronique, les étapes de formation des spinules ou spinulogénèse n'ont pas encore été toutes découvertes.

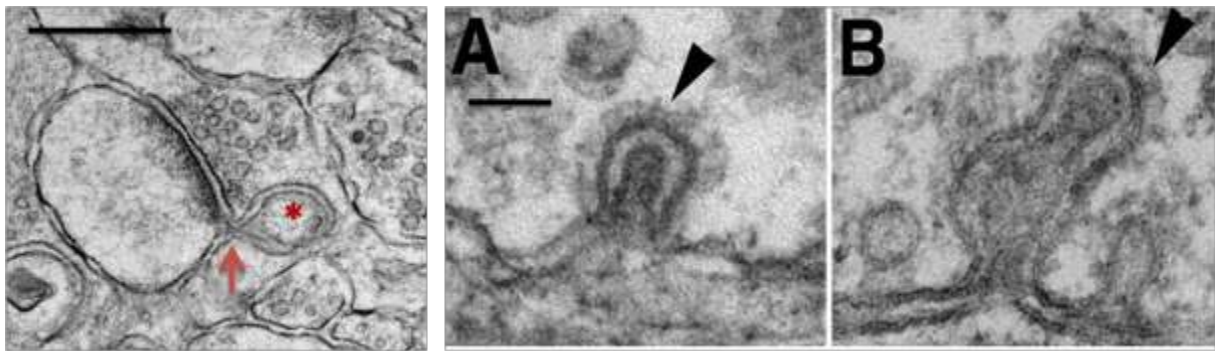


Figure 17: Les spinules à la synapse.

Electronographies de spinules pointant depuis l'épine vers le bouton axonal dans la région CA1 de la souris Swiss (gauche) et du rat Sprague-Dawley (A & B). Notez la constriction du spinule à l'interface des membranes axono-spinales (flèche rouge) et l'absence de zone dense aux électrons (astérisque), donc l'absence de composants de la PSD dans le spinule. La présence de clathrines se remarque au sommet du spinule (pointes de flèche, A & B). Barre d'échelle : 250 nm (gauche) et 100 nm (A & B). Adapté de Tao-Cheng et al., 2009.

1.2.4.2. Rôle des spinules

Les spinules font l'objet d'une hypothèse très controversée : le dédoublement synaptique. C'est notamment Carlin et Siekevitz qui initièrent cette théorie en 1983. En effet, de nombreuses études ont montré qu'une stimulation électrophysiologique, chimique, ou comportemento-environnementale induisait la présence et /ou l'augmentation de synapses dites perforées (Greenough et al., 1978 ; Harris et al., 1992 ; Spacek and Harris, 1997). Ces synapses présentent d'abord une PSD non-disjointe/maculaire, qui se perfore sous l'effet d'une stimulation suffisante et prend alors différentes formes (en forme de cercle ou de fer à cheval ou en segments disjoints (Figure 18).

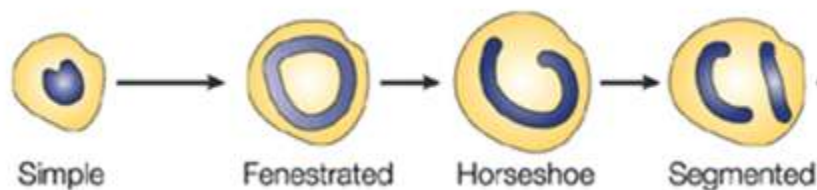


Figure 18: La PSD d'une synapse maculaire à perforée.

Sous stimulation intense, la PSD s'évide (fenestrated), puis est clivée en structure « fer à cheval », (Horseshoe) et se segmente enfin en deux entités distinctes (segmented). Adapté de Hering et Sheng 2001.

Les synapses perforées pourraient être une phase intermédiaire d'un processus de duplication synaptique créant des synapses de type branché, en réponse à une activité profonde et maintenue. Cette théorie ne fait absolument pas l'unanimité dans la communauté scientifique car d'autres études ont montré des résultats contraires (Tableau 3).

| Les synapses se divisent par duplication synaptique | |
|---|---|
| oui | non |
| L'induction de LTP crée de nouveaux contacts axono-spinaux à partir d'un seul contact préexistant (Toni et al., 1999) | L'induction de LTP dans l'hippocampe n'induit pas de synapses branchées/dupliquées (Fiala et al., 2002) |
| Des rats placés dans un environnement riche présentent plus de synapses perforées dans leur cortex occipital que des rats isolés (Greenough et al., 1978) | Par induction de LTP, les synapses branchées n'ont pas été vues faisant contact avec un seul bouton axonal (Sorra et al., 1998) |
| Le comportement parental chez la souris induit des perforation de la PSD vues par cryo-fracture qui seraient à l'origine d'une duplication synaptique (Hatton & Ellisman, 1982) | L'induction de mémoire associative chez le lapin montre une apparition de boutons à multicontacts post-synaptiques liés au réarrangement de synapses voisines, ou la création de nouvelles épines filopode-dépendantes (Geinisman et al., 2001) |

Tableau 3: Polémiques autour du processus de duplication synaptique.

Liste non-exhaustive de travaux notables montrant l'implication ou non d'épines perforées/dupliquées dans le processus de dédoublement.

Dans la théorie du dédoublement synaptique, les spinules sont considérés comme très impliqués dans ce processus. En effet, leur présence évolue de la même façon que les synapses perforées en réponse à une activité intense (Figure 19). Ainsi, l'application exogène de glutamate (Richards et al., 2005), une stimulation par moyen électrophysiologique (Toni et al., 1999) ou encore l'application de potassium en haute concentration (Tao-Cheng et al., 2009) induisent l'apparition de spinules. Le calcium et la protéine kinase calcium-calmoduline dépendante II ou CamKII sont également impliqués dans ce processus (Weiler et al., 1995 ; Weiler et al., 1996). Tous ces éléments mettent en évidence la présence de spinules dans un contexte de forte activité synaptique. En résumé, l'ensemble des études appliquées

aux spinules mettent en évidence une apparition et une corrélation dans les processus de potentialisation synaptique, ce qui fait d'eux un index structural supplémentaire de plasticité.

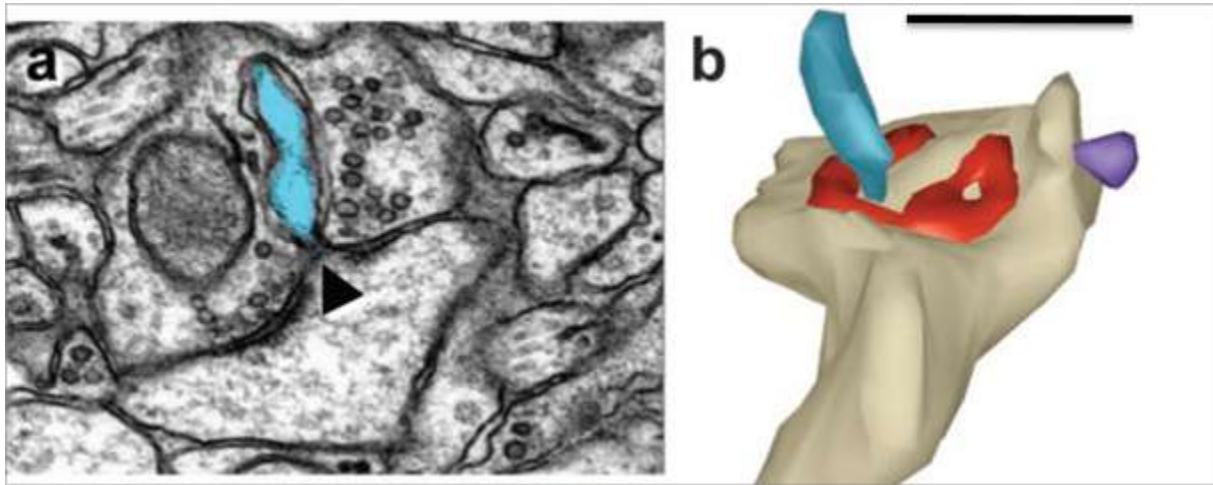


Figure 19: Couplage synapse perforée/spinule.

A, électronographie de synapse asymétrique avec une PSD perforée (pointe flèche) et le spinule (bleu). B, reconstruction 3D de la synapse où figurent le même spinule (bleu) un autre spinule de petite taille (mauve) et la PSD perforée (rouge) adoptant une configuration dite « fer à cheval ». Barre d'échelle : 500nm. Adapté de Spacek and Harris, 2004.

Des études sur les spinules ont émergé deux modèles possibles de leur implication dans les phénomènes de plasticité et/ou de dédoublement synaptique. L'un stipule que le spinule est impliqué dans la perforation de la PSD et induit la division axiale des compartiments axono-spinaux en une synapse de type branché (Figure 20). L'autre affirme que le spinule intervient dans la régulation d'ajouts de membrane par le réticulum endoplasmique lisse ou REL (Figure 21) et qu'il pourrait véhiculer des messagers secondaires comme le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP_3 , Ueda & Hayashi, 2013) en pré-synaptique et ainsi servir de lien entre plasticité pré et post-synaptique.

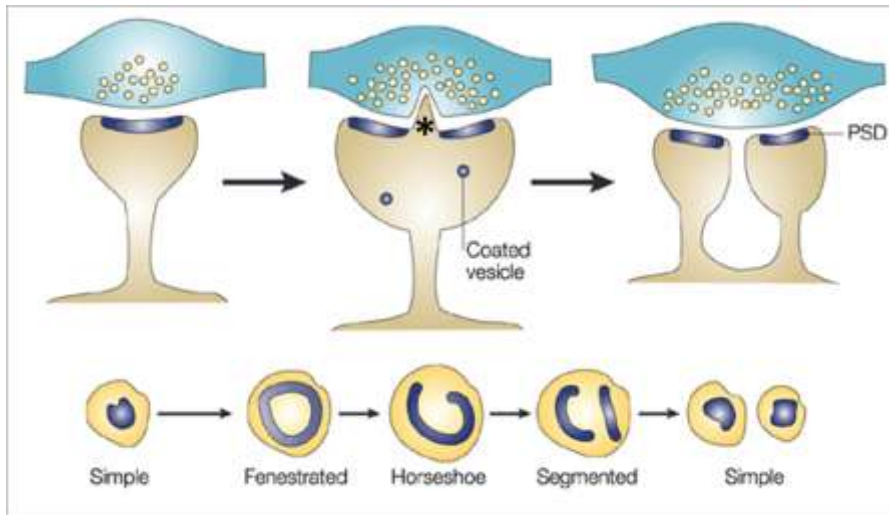


Figure 20 : Hypothèse du dédoublement synaptique.

Schéma mécanistique montrant l'implication des spinules et synapses perforées dans la duplication synaptique. Au départ, la synapse est mono-spinale, et présente une PSD simple ou maculaire (gauche). Lors d'une activité synaptique intense, la PSD se perforé en différentes formes (milieu). A la membrane dépourvue de PSD se forme un spinule (astérisque) pointant vers le bouton axonal. La résultante finale est la division axiale de la synapse en deux unités distinctes (droite) avec une PSD de nouveau maculaire. Adapté de Hering and Sheng, 2001.

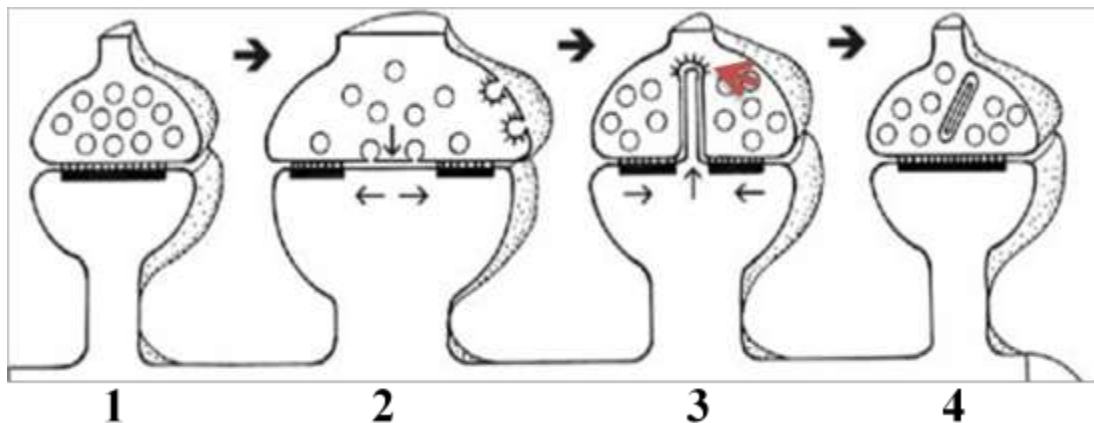


Figure 21 : Théorie de l'implication des spinules dans le renforcement synaptique.

Schéma mécanistique montrant l'implication des spinules et synapses perforées dans les phénomènes de plasticité. Lorsque la synapse est fortement activée, la PSD se segmente (1-2) pour laisser place à la formation d'un spinule (3) pointant vers le bouton axonal. Notez la présence de clathrine, caractéristique d'un processus d'endocytose (flèche rouge), alors que la PSD commence son rassemblement. Le spinule est enfin complètement absorbé par l'espace pré-synaptique (4), la PSD est de nouveau maculaire. Ici le spinule serait impliqué dans la régulation d'excédents membranaires apportés par le REL et transporterait des messagers secondaires effecteurs dans le bouton. Adapté de Spacek & Harris, 2004.

Le questionnement quant au dédoublement synaptique et à la formation des spinules est malheureusement limité par les contraintes techniques actuelles qui restreignent un suivi cinétique à la microscopie optique et donc à ses limites de résolution inhérentes. La microscopie électronique apporte une vue ultrastructurale des processus en question, mais uniquement à partir de matériel fixé. Il est certain que de nombreuses propriétés du spinule restent encore à découvrir. Si ce compartiment spinal est encore bien mystérieux, la tête et le cou de l'épine ont été en revanche bien caractérisés, et constituent en eux-mêmes des spécificités structurales impliquées dans le bon déroulement de la neurotransmission excitatrice.

1.2.4.3. Tête et cou : implications dans la compartimentation biochimique et électrique des épines dendritiques

Les épines de type « mushroom » sont les plus actives sur le plan fonctionnel, preuve qu'une relation entre morphologie et fonction des épines existe. Au niveau de la tête, la taille de la PSD est directement proportionnelle au nombre de récepteurs au glutamate et plus particulièrement au nombre de récepteurs de type AMPA (du nom de leur agoniste pharmacologique l'acide *alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique*) qui font face à la fente synaptique où le glutamate est libéré par le bouton axonal. La taille de la tête étant liée au volume de la PSD, il existe donc une relation linéaire entre taille de la tête, taille de la PSD et nombre de récepteurs AMPA (Harris et al., 1992 ; Spacek and Harris, 1997 ; Harris, 2008).

Un autre point très important est la régulation de diffusion moléculaire par le cou. En 2005, Bloodgood démontre par photoactivation que les propriétés de restriction de diffusion du cou empêchent la diffusion du marqueur photoactivé du cou vers la dendrite, et inversement (Bloodgood. & Sabatini, 2005). La stimulation des récepteurs au glutamate par le compartiment pré-synaptique induit l'entrée d'ions (Na^+ et Ca^{2+}) et dans certains cas particuliers que nous verrons plus loin, la production de messagers secondaires comme le calcium et l'activation de cascades de signalisation. Les capacités de restriction de la diffusion du cou permettent ainsi une séquestration spatiale des processus de signalisation, ce qui restreint les réactions chimiques au niveau local, mais aussi évite la diffusion d'éléments potentiellement toxiques comme le calcium vers la dendrite.

Certaines études ont proposé que le cou de l'épine se comporte comme un câble électrique, que le courant envahisse la tête de l'épine sans diminution, mais que la résistance générée par le cou diminue l'amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) se propageant vers la dendrite (revu par Tsay and Yuste, 2004). Par une technique optique de « glutamate uncaging » il a été montré que l'amplitude des potentiels mesurée au niveau du soma est inversement proportionnelle à la longueur du cou (Araya et al., 2006). L'indépendance électrique de l'épine pourrait expliquer l'atténuation des potentiels post-synaptiques excitateurs acheminés de l'épine jusqu'au soma, mais également l'intégration linéaire/arithmétique des PPSE au niveau du soma, susceptible de générer un potentiel d'action. Ce phénomène est particulièrement spécifique des synapses axono-spinales puisqu'il

a été montré que lors d'une activation de synapse axono-dendritique, chaque potentiel est susceptible d'altérer les potentiels voisins (Araya et al., 2006).

Les épines dendritiques peuvent donc être considérées comme des domaines sub-micrométriques neuronaux semi-autonomes, dynamiques, compartimentés sur le plan morphologique, électrique et biochimique. Ces particularités permettent l'activation spécifique des épines, associée à la libération de glutamate par le bouton axonal et l'induction de cascades de signalisation séquestrées au sein de l'épine. L'intégration linéaire des PPSE au niveau du soma pourrait quant à elle permettre l'induction de potentiels d'action par une activité synchrone de l'ensemble des synapses excitatrices.

L'isolation de l'épine sur le plan biochimique pourrait être à l'origine de changements morphologiques et fonctionnels plus ou moins durables qui font intervenir une machinerie protéique complexe et notamment des composants de la PSD. Dans le prochain sous-chapitre, nous allons nous intéresser aux constituants de la PSD, ainsi qu'à leurs effets dans un contexte de plasticité particulier : la potentialisation à long terme.

2. La PSD

La densité post-synaptique ou PSD tient son nom comme nous l'avons vu de sa particularité à être dense aux électrons et à apparaître comme une zone sombre de plusieurs dizaines de nanomètres d'épaisseur. Sa haute teneur en protéines et lipides la rendent résistante aux détergents, et c'est cette particularité qui est utilisée pour l'isoler et l'étudier (Carlin et al., 1980). Plus d'une centaine de protéines différentes ont été identifiées à ce jour. Sont présents à la PSD parmi ce spectre : des récepteurs-canaux, des récepteurs à activité tyrosine kinase, des canaux ioniques voltage-dépendants, des protéines d'échaffaudage comme la PSD-95, des molécules d'adhésion cellulaire responsables du lien physique entre axone et épine, de l'actine filamenteuse (actine-F) et globulaire (actine-G) et des protéines se liant à l'actine (Actin Binding Proteins) (Figure 22), entre autres. La PSD d'une synapse glutamatergique se compose notamment de récepteurs au glutamate tels le récepteur AMPA, NMDA (du nom de son ligand pharmacologique le N-méthyl-D-Aspartate) et kaïnate (du nom de son ligand, l'acide kaïnique). De par leur implication dans les processus de plasticité, seuls les récepteurs AMPA et NMDA seront décrits ici.

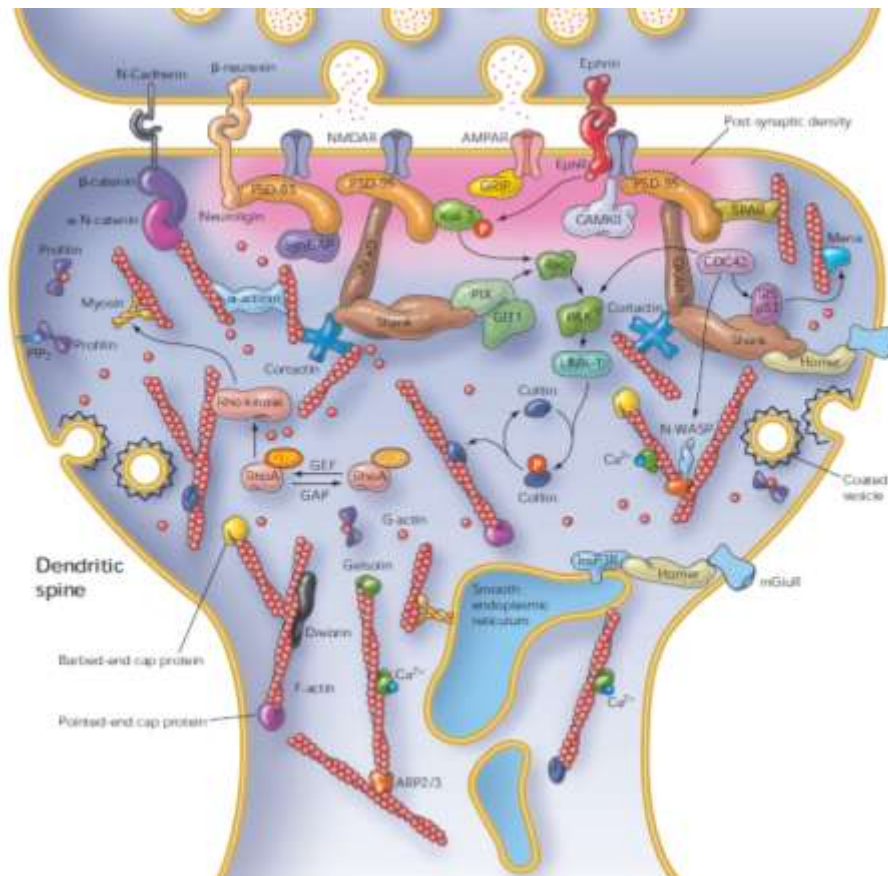


Figure 22: Architecture moléculaire de l'épine dendritique et de la PSD.

Schéma simplifié montrant l'organisation moléculaire de la PSD. La PSD (zone rose) fait face à l'élément pré-synaptique au niveau de la membrane plasmique de l'épine. Notez la présence de récepteurs à neurotransmetteurs (NMDAR et AMPAR dans le cas d'une synapse glutamatergique) et de protéines d'échafaudage (PSD-95, Shank). Le cytosquelette d'actine est très abondant et est décoré de protéines se liant à l'actine. Adapté de Calabrese et al., 2006.

2.1. Les récepteurs AMPA

Les récepteurs AMPA ou AMPAR sont des récepteurs-canaux glutamatergiques tetramériques. Les sous-unités possèdent un domaine C-terminal crucial dans la régulation de la fonction des AMPAR, incluant l'ouverture du canal, le déplacement et la stabilisation à la synapse (Anggono & Huganir, 2012). Les AMPAR sont sujets à un trafic vésiculaire intense où leur nombre à la PSD dépend de l'endocytose et de l'exocytose à la membrane post-synaptique ainsi que de leur diffusion latérale. Lors d'une LTP, les AMPAR sont exocytés au niveau de l'épine (Patterson et al., 2010). Au contraire, on observera davantage de phénomènes d'endocytose des AMPA dans le cadre d'une dépression à long terme (Long Term Depression ; LTD ; Kessels & Roberto, 2009).

2.2. Les récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA (NMDAr) sont des récepteurs ionotropiques à cinétique d'ouverture particulière. Elle dépend de deux facteurs : la fixation du glutamate pré-synaptique, et une dépolarisation de la membrane plasmique post-synaptique. Un bouchon fait d'un ion magnésium obstrue le canal, qui ne s'ouvre qu'après dépolarisation membranaire. Le NMDAr est perméable aux ions sodium, potassium et calcium, ce dernier étant un messenger secondaire essentiel pour les processus de plasticité. Nous reviendrons plus en détail sur la structure et la fonction des récepteurs NMDA dans la section 3.2.

2.3. Partenaires des AMPAr et NMDAr : exemples d'interaction avec PSD-95

La protéine de la densité post-synaptique de 95 kDa ou PSD-95 est membre de la famille des guanylate kinases associées à la membrane (MAGUK) et est très abondante et spécifique à la PSD. Elle régule de nombreux aspects de la neurotransmission synaptique. PSD-95 interagit avec un large spectre de partenaires comme les protéines d'adhésion et les récepteurs canaux tels les AMPAr et les NMDAr. Elle contribue à la localisation synaptique des NMDAr (Kim & Sheng, 2004). Elle permet une stabilisation des récepteurs AMPA à la synapse par interaction directe (Opazo et al., 2012).

Cette courte présentation des récepteurs AMPA et NMDA et d'une de leur voies d'adressage à la membrane n'est qu'un bref aperçu comparé à l'ensemble des processus signalétiques qui interviennent dans la régulation du trafic, de l'adressage et de la stabilisation de ces récepteurs. Les voies signalétiques sont légions et nous n'en ferons pas mention à l'exception de la kinase Erk. Il conviendra de garder à l'esprit que la plupart des études de signalisation post-synaptique se concentrent sur une ou plusieurs voies, mais qu'une myriade d'autres processus sont impliqués. On parlerait d'ailleurs de réseau signalétique plutôt que de cascade. Nous allons maintenant nous pencher sur le processus de plasticité. Puis à travers l'introduction du phénomène de LTP, nous étudierons l'implication des AMPAr et NMDAr dans ces phénomènes.

3. La plasticité synaptique

La plasticité synaptique est le terme regroupant l'ensemble des mécanismes morphologiques et moléculaires caractéristiques de la synapse excitatrice qui lui permettent d'adapter sa forme et sa force en fonction des stimuli reçus. Les synapses peuvent ainsi modifier leurs propriétés de neurotransmission, en fonction de l'usage qui en est fait. C'est le moyen pour le cerveau adulte d'apprendre de nouvelles tâches, de mémoriser de nouvelles informations et de s'adapter à son environnement.

3.1. Découverte de la potentialisation à long terme

Bliss et Lomo ont apporté en 1973 la première preuve de l'existence d'un tel mécanisme plastique dans l'hippocampe avec la découverte de la potentialisation à long terme (Bliss & Lomo, 1973). Opérant sur des lapins anesthésiés, des électrodes de stimulation ont été implantées dans leur hippocampe au niveau de la voie perforante (PP) et des électrodes d'enregistrement au niveau du gyrus denté (AD) (Figure 23). Bliss et Lomo ont ensuite appliqué une stimulation ponctuelle de haute fréquence (15 Hz, 10 secondes) et ont montré que cette dernière induisait et de manière prolongée une augmentation de l'amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) évoqués dans le gyrus denté, au niveau des électrodes d'enregistrement. L'amplitude des PPSE serait donc potentialisée pendant plusieurs heures, même après retour à des fréquences de stimulation normale (1Hz), d'où le nom de potentialisation à long terme.

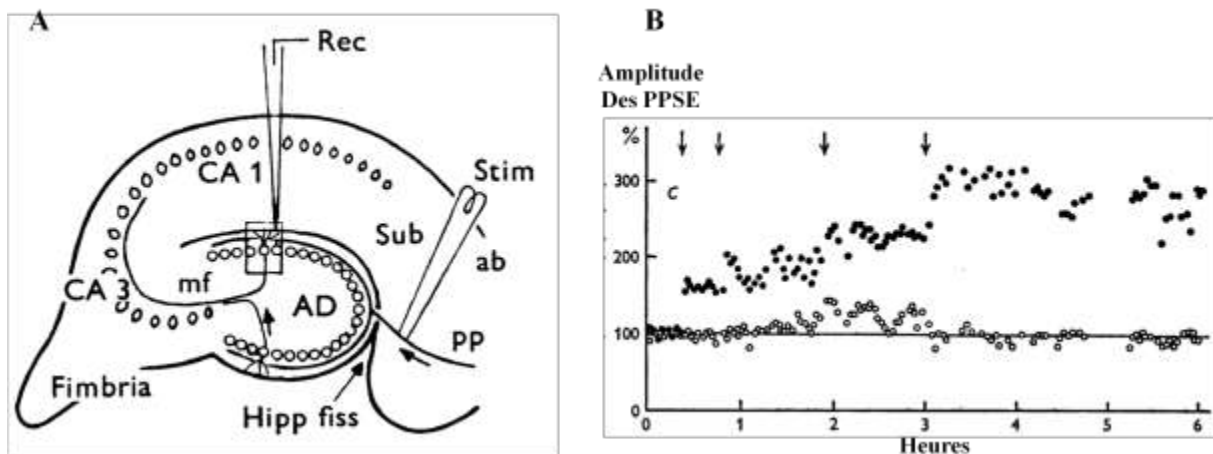


Figure 23 : Mode opératoire d'induction de LTP dans l'hippocampe

A, représentation schématique d'un hippocampe en vue coronale. L'électrode de stimulation est implantée au niveau de la voie perforante provenant du cortex entorhinal (PP). L'électrode d'enregistrement se situe au niveau du gyrus denté (AD). B, graphique représentant l'amplitude de PPSE enregistrés dans le gyrus denté, en fonction du temps. Les cercles pleins montrent la voie potentialisée et les cercles vides au contrôle ipsilatéral. La ligne de base (100%) correspond aux PPSE évoqués par le stimulus contrôle préalable à la potentialisation. Une stimulation tétanique (15 Hz, 10 sec) est appliquée à 4 reprises (flèches). La condition contrôle ne subit pas de stimulation tétanique. Adapté de Bliss et Lomo, 1973.

Depuis la démonstration de son existence dans l'hippocampe, la LTP a été mise en évidence dans d'autres régions cérébrales comme l'amygdale, le cervelet ou dans différentes aires du cortex. La modulation des acteurs de la LTP par l'ajout d'effecteurs pharmacologiques par exemple, induit des altérations dans les capacités d'apprentissage chez l'animal (Morris et al., 1986). Une autre étude notable et plus récente réalisée chez le rat par

Whitlock et collaborateurs a montré que la réalisation de tâches d'apprentissage spatial induisait le même effet qu'une stimulation haute fréquence dans la région CA1 de l'hippocampe (Whitlock, J.R. et al., 2006). Cette étude confirme donc la présence de processus mnésiques physiologiques et analogues au paradigme électrophysiologique de potentialisation à long terme.

Comme nous en avons fait mention dans le paragraphe 2.3., la LTP ne découle pas d'un seul mécanisme moléculaire, mais d'un ensemble intégratif de dizaines de voies signalétiques, aboutissant à des remodelages morphologiques et moléculaires profonds qui modifient de manière durable les capacités de neurotransmission et donc la force synaptique. A l'inverse de la LTP, il existe un autre paradigme pouvant être induit par des stimulations basse fréquence, et qui se caractérise par une diminution prolongée de l'efficacité de neurotransmission. Ce mécanisme s'appelle la dépression à long terme ou LTD et fait appel à des processus cellulaires plutôt inverses à ceux de la LTP.

Les processus impliqués dans les phénomènes pré-synaptiques de la plasticité reposent quant à eux essentiellement sur la modulation des vésicules à glutamate dans leur nombre, leur adressage à la zone active ou leur probabilité d'exocytose (voir pour revue Michel et al., 2015). Nous centrerons notre étude sur les phénomènes de plasticité post-synaptique qui sont les plus manifestes.

3.2. Mécanismes moléculaires de la LTP

3.2.1. Généralités

Dans une étude en 1986, Morris et collaborateurs ont montré l'importance de l'hippocampe dans la mémorisation spatiale. Par injection chez des rats d'acide D,L -2-amino-5-phosphonopentanoïque ou AP5, un antagoniste des récepteurs NMDA, le processus de LTP se trouvait alors bloqué. Les rats montraient également une perte de performance d'une tâche de mémorisation spatiale, la piscine de Morris (1986). La spécificité du NMDAr provient notamment de sa perméabilité au calcium et de sa régulation chimique/électrique.

Dans le cas d'une neurotransmission simple et unique, le potentiel d'action induit une entrée de calcium dans l'espace pré-synaptique ce qui induit l'exocytose des vésicules à la zone active et libère le glutamate dans la fente synaptique. Le glutamate se fixe aux récepteurs AMPA et NMDA (Figure 24). Seul le récepteur AMPA s'ouvre car le canal du récepteur NMDA est obstrué par un bouchon fait par un ion magnésium (Mg^{2+}). L'expulsion du bouchon nécessite une dépolarisation membranaire. Le récepteur AMPA laisse entrer des ions sodium, ce qui peut dépolariser la membrane. Il peut y avoir alors déclenchement d'un PPSE, mais cette stimulation n'est pas assez forte pour induire l'activation soutenue des récepteurs NMDA requise pour l'induction des mécanismes moléculaires de la LTP.

Dans le cas d'une stimulation répétée, l'augmentation de fréquence des potentiels d'action entraîne la libération toujours plus croissante de glutamate dans la fente synaptique, augmentant l'activation des récepteurs AMPA, ce qui laisse entrer ainsi toujours plus de sodium dans la région post-synaptique. Si la stimulation est suffisante, l'influx de cations dépolarise la membrane ce qui éjecte le bouchon magnésium du NMDAr. Dans de telles conditions de stimulation, l'ouverture du canal permet une entrée massive de calcium dans l'épine dendritique (Figure 24). Le récepteur NMDA n'est donc actif que si la fixation du glutamate provenant du bouton axonal et la dépolarisation membranaire post-synaptique se produisent de manière concomitante. L'ouverture du récepteur NMDA se fait donc par détection de coïncidence. L'intense stimulation permet un influx massif de calcium dans l'épine, qui va jouer un rôle d'inducteur de LTP

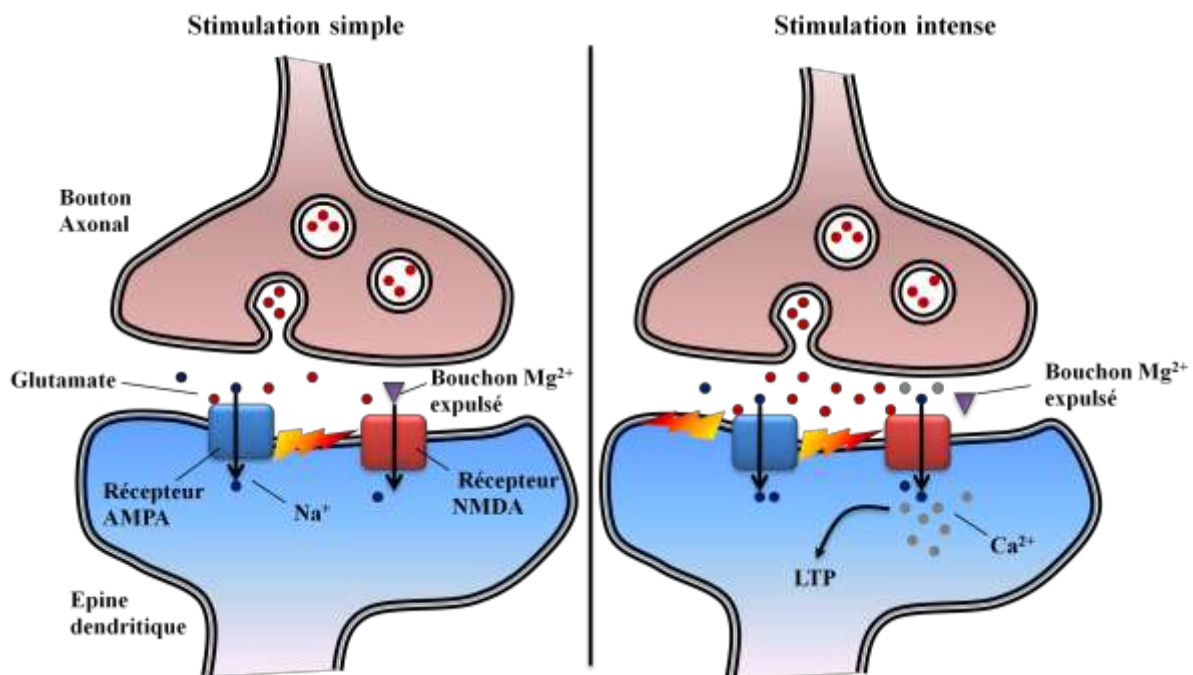


Figure 24 : L'induction de LTP est dépendante de l'ouverture des récepteurs post-synaptiques glutamatergiques NMDA.

Schéma mécanistique simplifié du processus requis pour l'entrée de calcium par les NMDAr dans l'épine nécessaire à l'induction de LTP. L'ouverture requiert la fixation du glutamate sur les NMDAr dans le cas où la membrane est dépolarisée grâce aux AMPAr, ce qui permet la libération du magnésium et l'ouverture du canal NMDA. Si la stimulation est suffisamment intense, l'influx suffisant de calcium nécessaire à l'induction de LTP. Inspiré de Purves et al., 2004.

Le calcium constitue le messager par excellence de l'induction de LTP. La suppression de calcium libre de l'épine par ajout d'agents chélateurs de cations divalents comme l'EGTA bloque le processus de LTP (Lynch et al., 1983). Le calcium est maintenu séquestré au niveau de la tête de l'épine grâce à son cou étroit qui restreint les capacités de diffusion. Le calcium va induire l'activation de protéines kinases et notamment les protéines kinases A et C (PKA, PKC, Malinow et al., 1988 ; Roberson & Sweatt, 1996), mais aussi et surtout la protéine

kinase II calcium-calmoduline dépendante ou CamKII. Cette enzyme est très abondante à la PSD et très impliquée dans les processus de potentialisation synaptique (Malinow et al., 1988). A titre d'exemple, l'un des effets connus est la phosphorylation par la CamKII de la sous-unité GluA1 en sérine 831 du récepteur AMPA, ce qui augmente sa conductance (Derkach et al., 1999; Lisman et al., 2012).

L'augmentation de la force synaptique implique notamment un recrutement de nouveaux récepteurs AMPA par une fusion de vésicules à la membrane post-synaptique ou péri-synaptique (Hayashi et al., 2000 ; Brecht & Nicholl, 2003). La raison du recrutement d'AMPA à la PSD pour l'établissement de la LTP est très simple : plus la PSD contient de récepteurs AMPA, plus il y a de sites potentiels de fixation du glutamate à la PSD, plus l'influx de sodium par les AMPA sera important. L'épine sera donc davantage susceptible d'être dépolarisée et donc de déclencher un PPSE, pour une même libération de glutamate. Un autre mécanisme impliqué dans le recrutement d'AMPA est la phosphorylation par CamKII ou PKC de la stargazine. Cette protéine appartient à la famille des TARP ou Trans-membrane AMPA receptor Related Protein. La stargazine est associée au récepteur AMPA qui diffuse sur la membrane plasmique de l'épine. La phosphorylation de la stargazine lui permet de se lier à PSD-95 (voir pour revue Lisman et al., 2012.) ce qui permet une séquestration spatiale des AMPA à la PSD.

Il faut comprendre, comme nous le verrons au chapitre 3, que ces modifications fonctionnelles s'accompagnent de modifications morphologiques. Ainsi, la force synaptique évolue proportionnellement avec la forme de l'épine. A l'inverse de la LTP, le processus de dépression à long-terme, dû à une stimulation synaptique basse fréquence, va induire la réduction du nombre de récepteurs AMPA à la PSD, associée à un rétrécissement du volume de l'épine. Si la LTP est induite par un influx massif de calcium dans l'épine, la LTD se traduit par une faible entrée de calcium, ce qui va plutôt activer des protéines phosphatases que des kinases (Morishita et al., 2001). Les phosphatases sont responsables de l'endocytose des AMPA depuis la PSD, mais également de la diminution du volume de l'épine.

Si le processus de LTP se produit dans le vivant et notamment chez l'homme, la potentialisation des synapses excitatrices doit pouvoir perdurer pendant des années, voire pour une vie entière. Ces mécanismes nécessitent une néo-synthèse protéique afin de constituer, puis de recruter de nouveaux éléments de la PSD. Des études penchées sur ce sujet ont utilisé des inhibiteurs de traduction (par l'ajout d'anisomycine) ou de transcription (par l'ajout d'actinomycine-D) (revu par Kelleher III et al., 2004) et ont permis de découpler la LTP en 3 phases :

- La phase précoce ou Early-LTP (E-LTP) qui a lieu pendant la première heure et qui fait appel comme nous l'avons vu au recrutement d'AMPA à partir de réservoirs synaptiques (AMPA vésiculés), ainsi que la modulation de leur activité.

- La phase tardive ou Late-LTP (L-LTP) recrute la machinerie de traduction protéique de l'épine, et permet une synthèse rapide et localisée de nouveaux éléments de la PSD. Elle se produit 60 à 90 min après le début de l'induction de LTP.

-La phase persistante qui se produit environ deux heures après l'induction, et qui ici se traduit par l'activation et la translocation d'activateurs de facteurs de transcription, de l'épine vers le noyau. Ce processus permettra *in fine* une production additionnelle d'éléments protéiques post-synaptiques.

Dans la prochaine sous-partie nous allons présenter la kinase Erk et son implication dans les voies de signalisation précoces et plus tardives de la LTP.

3.2.2. La kinase Erk

La protéine Erk ou Extracellular-signal Regulated Kinase est une protéine appartenant à la famille des MAPK ou kinases activées par facteur mitotique (Mitogen Activated Protein Kinases). Le rôle d'Erk est très connu dans les grands mécanismes cellulaires comme la différenciation, ou la prolifération. Mais des fonctions synaptiques des isoformes 1 & 2 lui ont également été attribuées. La kinase Erk est essentiellement activée par phosphorylation sur ses résidus, en position thréonine 202 et tyrosine 204. L'activation d'Erk est impliquée dans de nombreux processus plastiques.

Parmi ses effets notables dans les phases précoces de la LTP, Erk est en partie responsable de l'exocytose des AMPAr à la membrane post-synaptique (Patterson et al., 2010, Figure 25). Erk peut également phosphoryler PSD-93, un analogue de PSD-95, ce qui permet à cette protéine d'échafaud d'interagir avec le récepteur NMDA (Guo et al., 2012). Son activation est NMDAr-CamKII dépendante (El Gaamouch et al., 2012). De plus, Erk exerce également un rôle d'activateur de facteurs de transcription. En effet, une fois activée puis transloquée dans le noyau, Erk active des facteurs de transcription comme les CREB (cAMP response element-binding protein) ou encore Elk-1, qui initient la transcription de gènes associés à la mémoire (Davis et al., 2000). Erk est donc très impliquée dans les processus cellulaires mnésiques et constitue un marqueur fiable du niveau d'activation de la synapse (Figure 25), que nous utiliserons en tant que tel dans notre étude.

Nous venons de voir que les processus cellulaires de mise en mémoire nécessitent une machinerie moléculaire synaptique complexe et hautement régulée qui a pour but d'augmenter la réponse post-synaptique face à une stimulation pré-synaptique. Mais cette augmentation de la force synaptique s'accompagne de remodelages morphologiques concomitants avec les remodelages fonctionnels, qui s'appuient sur des modifications de la dynamique et de la conformation de son cytosquelette d'actine, qui régit la forme de l'épine (Fukazawa et al., 2003). Au cours du prochain chapitre, nous allons nous intéresser à l'actine dans l'épine.

Nous rappellerons en premier quelques bases de la biochimie intrinsèque des filaments d'actine. Puis nous nous pencherons sur leur régulation par la grande famille des Actin Binding Proteins ou ABP et notamment par la Cofiline. Nous verrons ensuite comment se comportent l'actine et les ABP dans le contexte de la LTP et notamment, par quels mécanismes signalétiques l'épine associe changements morphologiques et changements

fonctionnels. Puis nous nous intéresserons aux dernières données publiées quant aux altérations des ABP et de l'actine synaptique dans la maladie d'Alzheimer.

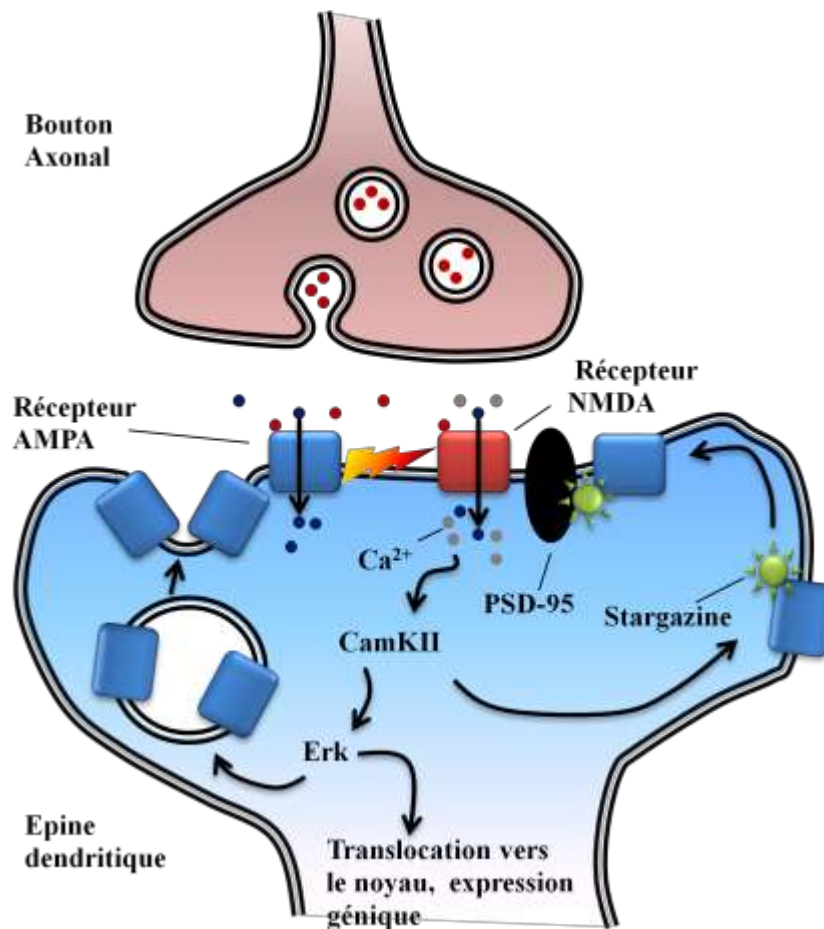


Figure 25 : L'ajout de nouveaux récepteurs AMPA pendant la LTP peut se faire par ancrage et séquestration à la PSD et par exocytose.

Schéma illustratif de quelques mécanismes d'induction de LTP. L'influx de calcium active la CamKII qui active Erk. Cette dernière induit l'exocytose des récepteurs AMPA à la membrane post-synaptique. CamKII active également la stargazine qui peut ainsi se lier à PSD-95 et maintenir son AMPAr partenaire séquestré à la PSD, donc face à l'élément pré-synaptique. Dans les phases tardives de la LTP, Erk peut être transloquée dans le noyau et active ses substrats-facteurs de transcription pour néo-synthèse d'éléments de la PSD. Ne figurent pas sur ce schéma l'implication des autres kinases (notamment PKC) et leurs substrats.

Chapitre 3 : l'Actine et la Plasticité synaptique

Le cytosquelette est composé de différentes structures organisées par la polymérisation de protéines élémentaires. On distingue trois types de structures dans la cellule : les microtubules (MT), les filaments intermédiaires (FI) et les microfilaments d'actine (ou actine-F). Ce cytosquelette est impliqué dans le transport des protéines et organelles de la cellule et dans le maintien de la morphologie cellulaire. Les microtubules sont les éléments les plus volumineux. Ils se présentent sous la forme d'un cylindre creux, d'un diamètre de 25 nm et composés généralement de 13 proto-filaments faits de dimères d' α et de β -tubuline. Ils sont organisés au niveau de centres de nucléation appelés MTOC (MicroTubule Organisation Center) au niveau des centrosomes. On les retrouve abondamment dans l'arborescence dendritique. Les filaments intermédiaires sont de diamètre plus petit : environ 10 nm, et moins dynamiques. Plus de 70 protéines possédant des domaines structuraux semblables peuvent s'auto-assembler et former des filaments intermédiaires. On les retrouve notamment connectés aux organites ou à l'enveloppe nucléaire. Les microfilaments d'actine sont des polymères de 7 nm de diamètre, composés de 2 brins associés de manière hélicoïdale. Ces filaments sont assemblés au niveau de centres organisateurs WASP (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein) et WAVE (WASP-family verprolin-homologous *protein*) et subissent des cycles récurrents de polymérisation/dépolymérisation régulés par différentes protéines se liant à l'actine. Cette dynamique est exploitée dans différents processus cellulaires comme la migration cellulaire, ou l'organisation des épines dendritiques. Dans les paragraphes suivants nous nous intéresserons plus particulièrement aux propriétés biochimiques des microfilaments d'actine, à leur dynamique et leur régulation dans la plasticité synaptique. Pour plus de clarté, le filament sera schématisé comme étant constitué d'un seul brin.

1. Biochimie de l'actine

1.1 L'actine-G monomérique

L'actine-F résulte de l'assemblage de sous-unités d'actine monomérique ou actine-G, protéine globulaire d'environ 41-43 kDa. Les interactions entre les sous-unités sont non-covalentes, ce qui permet aux polymères de s'assembler ou se désassembler en quelques secondes à quelques minutes : ils sont donc dynamiques. Les monomères d'actine fixent des cations divalents, notamment le calcium et le magnésium, ainsi qu'un nucléotide ATP ou ADP (Adénosine Di-Phosphate). L'actine-G peut libérer son ADP et lier de l'ATP, qui est en plus grande concentration dans le cytosol. L'actine-G possède 4 sous-domaines : Les sous-domaines 1 et 3 constituent l'extrémité dite barbée du filament alors que les sous-domaines 2 et 4 constituent l'extrémité dite pointue (Figure 26, Graceffa & Dominguez, 2003). La structure de l'actine-G et notamment de ses sous-domaines 2 et 4 diffère légèrement, selon la

nature du nucléotide fixé (Actine-ADP ou Actine-ATP), mais on la retrouve liant davantage de l'ATP que de l'ADP.

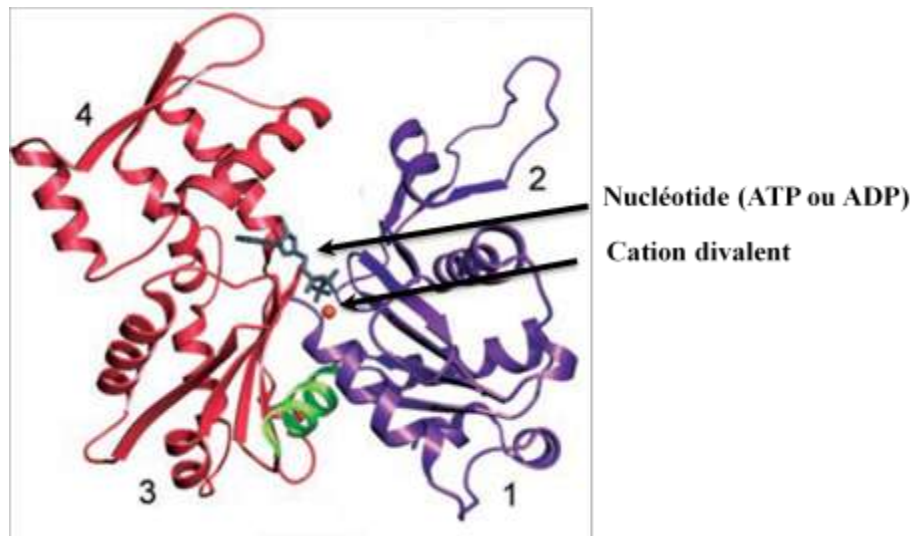


Figure 26: Structure tridimensionnelle du monomère d'actine résolue par cristallographie.

Les 4 sous-domaines composent le monomère d'actine. Les sous-domaines 1 et 3 constituent l'extrémité barbée alors que les sous-domaines 2 et 4 forment l'extrémité pointue. Notez la présence d'un nucléotide et d'un ion Mg^{2+} ou Ca^{2+} dans une cavité, entre les sous domaines 2 et 4. Adapté de Graceffa & Dominguez, 2003.

1.2. Assemblage de l'actine : une dynamique en tapis-roulant

De façon intrinsèque, l'actine-G est chargée négativement, ce qui génère des forces répulsives dans une solution pauvre en sel et empêche les interactions entre monomères. L'augmentation *in vitro* de la concentration saline permet de tamponner les charges négatives et ainsi de favoriser le rapprochement mutuel des monomères. L'ATP permet le changement de conformation de l'actine-G requis pour la polymérisation, mais n'est pas utilisé à des fins énergétiques. En effet, il a été montré que les filaments peuvent polymériser *in vitro* avec de l'ADP ou même sans nucléotide (De La Cruz et al., 2000).

La formation du filament d'actine se déroule en 3 étapes (Figure 27) :

- 1) La première phase dite de nucléation est cruciale pour le développement du filament. Elle consiste en l'association de monomères d'actine-G en un trimère servant de noyau de nucléation. C'est l'étape limitante car elle est thermodynamiquement moins favorable que l'élongation. *In vivo*, elle se fait au niveau de sites de nucléation impliquant les protéines WASP et WAVE.

- 2) La seconde phase dite d'élongation consiste en l'assemblage du filament par ajout de monomères aux extrémités barbée et pointue du noyau de nucléation.
- 3) La troisième phase est la phase d'équilibre stationnaire où il y a autant de monomères assemblés que désassemblés.

Néanmoins l'actine est décrite comme polymérisant davantage à l'extrémité barbée ou bout (+), qu'à l'extrémité pointue ou bout (-). Les propriétés biochimiques intrinsèques du filament expliquent ce phénomène. La différence de polymérisation aux deux extrémités du filament d'actine peut s'expliquer par:

1) la concentration en actine-G dite critique, au delà de laquelle les filaments commencent spontanément à polymériser. La concentration critique de l'extrémité barbée (+) est plus faible que celle de l'extrémité pointue (-), ce qui signifie que l'actine polymérise à des concentrations en actine-G plus basses au bout (+) qu'au bout (-).

2) des différences d'affinités de l'actine-G avec le bout (+) et le bout (-) qui favorisent un assemblage d'actine-G-ATP préférentiellement avec le bout (+), et d'actine-G-ADP pour le bout (-). Cela se caractérise notamment par une constante d'association de $11,6 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour l'actine-G-ATP avec l'extrémité (+) versus $0,16 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour l'actine-G-ADP avec l'extrémité (-) (Pollard, 1986). Le bout (+) polymérise donc plus vite que le bout (-) et intègre préférentiellement de l'actine-G-ATP au filament (Pollard, 1986 ; revu par Pollard & Borisy, 2003) comme montré sur la figure 27.

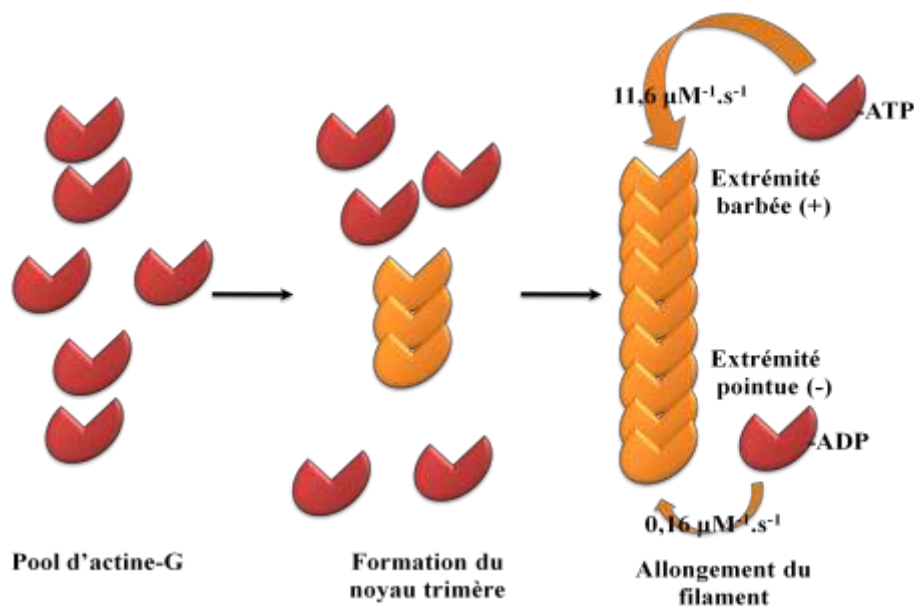


Figure 27 : La formation d'un filament d'actine se déroule en trois étapes.

Schéma mécanistique simplifié montrant le processus d'assemblage du filament d'actine. Avec une concentration en monomères (rouge) et saline suffisante, l'actine-F commence à s'assembler en formant d'abord un noyau de polymérisation. L'ajout de monomères aux extrémités allonge le filament. Mais l'actine-G-ATP s'ajoute préférentiellement au bout (+) alors que l'actine-G-ADP s'ajoute préférentiellement au bout (-). (Les cinétiques d'assemblage sont indiquées sur les flèches orange). Inspiré de Pollard and Borisy, 2003.

Dans ce cas, on peut se demander quels facteurs expliquent la dynamique d'assemblage plus lente au bout (-). Une des premières explications serait que la dynamique de polymérisation à l'extrémité (-) serait perturbée par des interactions électrostatiques qui défavorisent l'addition de sous-unités à cette extrémité (Sept et al., 1999). Plus récemment, il a été montré que les deux dernières sous-unités du filament interagissent de manière privilégiée l'une avec l'autre. Cela a pour conséquences de stabiliser les liens entre ces deux monomères et donc de rendre la dissociation plus difficile donc plus lente. L'ajout d'une nouvelle sous-unité à l'extrémité (-) serait également plus délicat car elle nécessiterait la rupture du contact préférentiel entre les deux dernières sous-unités du filament (Narita et al., 2011).

Ainsi, on observera sur le filament une polarisation des événements d'assemblage et de désassemblage où l'actine s'assemblera sur le filament de manière privilégiée au bout (+), alors qu'elle dépolymérisera davantage au bout (-) (De La Cruz & Gardel, 2015). Cette compartimentation spatiale induit un gradient de concentration en monomères d'actine, qui vont alors fluctuer spontanément du bout (-) vers le bout (+). On considère ainsi la dynamique de l'actine comme évoluant en tapis roulant ou « treadmilling » (Figure 28). Mais au cours de cette dynamique, les nucléotides liés aux filaments vont évoluer.

En l'espace de quelques secondes, l'actine-F peut hydrolyser de façon irréversible l'ATP lié en ADP + Pi. (Pollard and Borisy, 2003). La libération du phosphate inorganique est plus lente (6 min environ) et l'ADP reste associé au filament (Carlier & Pantaloni, 1986). La conformation du filament empêche tout échange de nucléotide entre monomères du filament et milieu extérieur, ce qui signifie que toutes les unités d'actine au sein du filament sont liées à de l'ADP. Ainsi, on peut estimer « l'âge » d'un monomère du filament en fonction du nucléotide fixé. Le bout (+) étant le siège principal de polymérisation, on retrouvera de l'actine-ATP. Puis, en suivant le filament vieillissant en direction du bout (-), on trouvera de l'actine-ADP-Pi, et à proximité du bout (-), de l'actine-ADP.

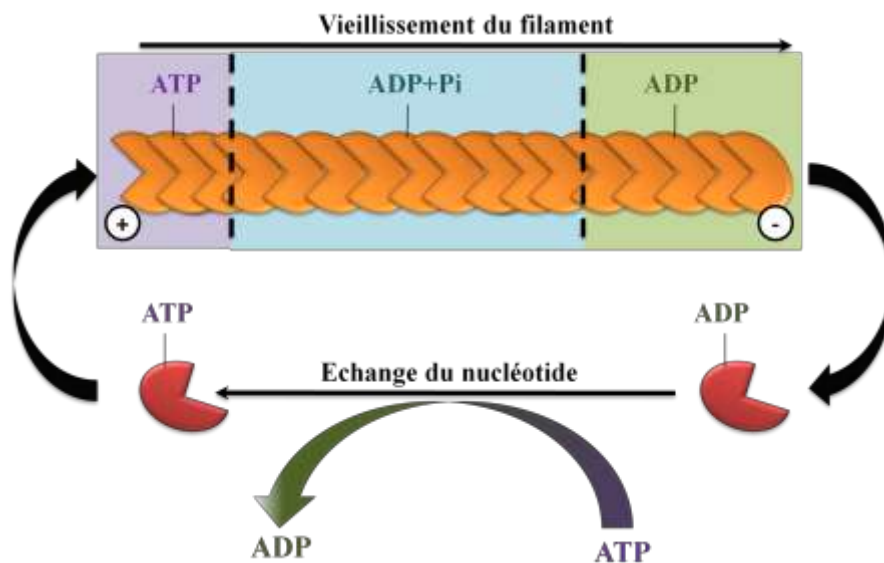


Figure 28 : le « treadmilling » d'actine et les différents états d'actine associés.

Schéma montrant le processus de treadmilling d'actine. L'actine-G-ATP s'intègre au filament au bout (+), puis hydrolyse rapidement le nucléotide en ADP+Pi. Le phosphate inorganique est libéré plusieurs minutes après, l'actine devient actine-ADP. Cette dernière se détache du filament et suit le gradient de concentration où pendant ce temps son ADP pourra être échangé en ATP. L'actine-G-ATP peut ensuite réintégrer le filament au bout (+) et recommencer le cycle.

2. Les Actin Binding Proteins

Bien que l'actine possède une dynamique intrinsèque, celle-ci est trop lente pour répondre à des besoins cellulaires de réarrangement local et rapide des filaments, par exemple dans la migration cellulaire. De plus, le fait que l'actine monomérique puisse s'assembler en trimères et créer un point de départ de polymérisation pourrait induire un développement des filaments incontrôlé sur le plan spatial et chronologique. Au cours du développement de la vie sur Terre, les organismes ont développé en conséquence une énorme machinerie protéique de régulateurs d'actine, afin de répondre à leurs besoins de réarrangement du cytosquelette dans divers processus cellulaires (Tableau 4). Cette super-famille de protéines nommée ABP pour actin-binding-protein va ainsi moduler différentes étapes du « treadmilling » d'actine notamment dans les processus de plasticité. Dans cette prochaine partie, nous présenterons quelques généralités sur la famille des ABPs, mais nous centrerons par la suite notre description sur la cofiline, à travers une explication de son activité, et de sa régulation en contexte de plasticité synaptique.

| Protéine | Effet sur le cytosquelette d'actine | Voie de signalisation dans l'épine |
|--|--|---|
| Nucléateurs Complexe Arp2/3 DRF3/mDia2 | Nucléation et formation de filaments branchés Induit l'élongation de filaments droits | Activé par Rac/Cdc42, inhibé par PICK1 (inhibé par Arf) Rif |
| Protéines régulatrices d'Arp2/3 Cortactine N-WASP WAVE-1 | Active Arp2/3 Active Arp2/3 Active Arp2/3 | Kinase de la famille des Src Cdc42/Rac & P _i P ₂ Rac et P _i P ₃ |
| Echangeur d'ATP Profiline | Augmente la vitesse de polymérisation | |
| Dépolymérisateur ADF, Cofiline, Gelsoline | Dépolymérise et coupe les filaments | Inhibée par Lim-k1, activée par SSH1 |
| Protéine de coiffe Esp8 | Se fixe au niveau des bouts (+) | Inhibée par la voie des MAPK |
| Protéine de cross-link α -actinine CamKII β | Rassemble les filaments en faisceaux Regroupe et stabilise les filaments | Inhibée par FAK Activée par NMDAr et Ca ²⁺ |
| Moteurs moléculaires Myosine II et VI | Requis pour la morphogénèse du cou et de la tête des épines | RhoA |

Tableau 4 : Les protéines régulatrices d'actine synaptique.

Liste non-exhaustive de protéines se liant à l'actine, retrouvées dans l'épine dendritique et leur(s) voie(s) de régulation. Adapté de Hotulainen and Hoogenraad, 2010.

La dynamique de l'actine joue un rôle essentiel dans la physiologie du neurone, et plus particulièrement dans les processus de plasticité synaptique (Okamoto et al., 2004). Lors d'une intense activation de l'élément pré-synaptique, l'épine s'adapte et module sa morphologie, ce qui requiert un changement conformationnel de son cytosquelette d'actine, rapide et immédiat. Pour compenser la faible dynamique intrinsèque du filament d'actine, l'épine module l'activité des ABP. Elles peuvent par exemple accélérer ou ralentir la vitesse du treadmilling, en jouant sur certaines étapes de ce processus. Les ABP peuvent également rassembler les filaments en macrostructures organisées en faisceaux ou en réseau (Figure 29).

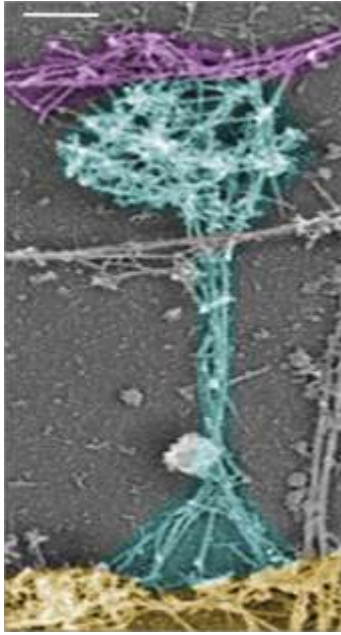


Figure 29 : Organisation des filaments d'actine dans l'épine.

Electronographie obtenue par ombrage métallique de platine montrant l'organisation de l'actine dans une épine Mushroom. Le bouton axonal, l'épine et la dendrite sont pseudo-colorés en violet, cyan et jaune respectivement. Notez l'organisation des filaments en faisceaux dans le cou, et en réseau branché dans la tête. Barre d'échelle : 200 nm. Adapté de Korobova and Svitkina, 2010.

Parmi ces ABP, le complexe Arp2/3 ou Actin Related Protein 2/3 est un facteur de nucléation essentiel dans le processus d'élargissement de la tête de l'épine (Hotulainen et al., 2009). Arp2/3 peut en effet créer un nouveau filament d'actine, en se fixant sur un préexistant. C'est un complexe heptamérique fait des sous-unités Arp2 et Arp3 ainsi que 5 autres protéines nommées ArpC1 à ArpC5. L'étude comparative des structures tri-dimensionnelles a permis de montrer de grandes analogies entre les sous-unités Arp2 et Arp3 et l'actine (Robinson et al., 2001). Son activation requiert la présence d'un NPF ou Facteur Promoteur de Nucléation comme le facteur N-WASP, qui lie et amène un monomère d'actine au complexe Arp2/3 (Wegner et al., 2008). Ce mimétisme moléculaire permet notamment de générer une structure très analogue à un trimère d'actine, sur le filament où le complexe s'est fixé. Le pseudo trimère d'actine permet ensuite la polymérisation d'un nouveau filament, depuis le premier. Une autre ABP, la protéine de coiffe CP (capping protein) agit synergiquement avec Arp2/3 (Figure 30). CP se fixe à l'extrémité barbée ou (+) des filaments d'actine (ce qui empêche leur élongation) et facilite la formation de points de nucléation par Arp2/3 (Akin & Mullins, 2008).

Ainsi, l'activation simultanée de l'ensemble des complexes Arp2/3 au sein d'une épine permet la génération rapide d'un réseau branché de filaments d'actine, servant d'échafaudage pour d'autres processus de plasticité (Pollard & Borisy, 2003). Il existe également une autre classe de facteurs de nucléation : la famille des formines. Parmi elles, le complexe mDia2/Drf3 est impliqué dans la nucléation de filaments d'actine dans les processus de morphogénèse du filopode (Block et al., 2008). Néanmoins, la génération de nouveaux filaments soit par Arp2/3, soit par mDia2 requiert l'apport de monomères à l'extrémité (+), ce qui est pris en charge par d'autres ABP.

L'actine-G monomérique ne diffuse pas librement dans le cytoplasme. Les monomères sont séquestrés notamment par la Profiline dont l'isoforme II est la plus abondante dans le

cerveau (Ackermann & Matus, 2003). La Profiline empêche les monomères de nucléer spontanément entre eux, permet leur l'acheminement aux extrémités (+) des filaments, et catalyse l'échange d'ADP du monomère en ATP (Figure 30). Elle est recrutée dans l'épine lors des processus de LTP (Ackermann & Matus, 2003) et son activation est notamment NMDAr-dépendante.

D'autres ABP peuvent également rassembler les filaments d'actine en faisceaux ou « bundles », qui sont particulièrement présents dans le cou. L' α -actinine est impliquée dans ce processus de par sa capacité à s'associer aux filaments et à induire leur organisation en faisceaux ou en réseau croisé (Cingolani & Goda, 2008). Le réseau d'actine est important dans la régulation des récepteurs ionotropiques du glutamate et notamment dans leur ancrage à la PSD. L' α -actinine permet l'interaction entre l'actine-F et le récepteur NMDA en s'y associant de manière activité-dépendante (Sekino et al., 2007 ; Cingolani & Goda, 2008).

La CamKII est également impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine de l'épine dendritique, en plus de son rôle majeur dans les processus fonctionnels de la plasticité. L'isoforme CamKII β a été montrée comme associée aux filaments d'actine lorsque l'épine est au repos (Okamoto et al., 2007 ; Lin & Redmond, 2008). Son activation calcium-dépendante induit son détachement du filament, ce qui permettrait le réarrangement du réseau d'actine par les ABP. La CamKII β retournerait ensuite à l'état lié à l'actine dans des conditions de nouveau de repos (Okamoto et al., 2007 ; Lin & Redmond, 2008).

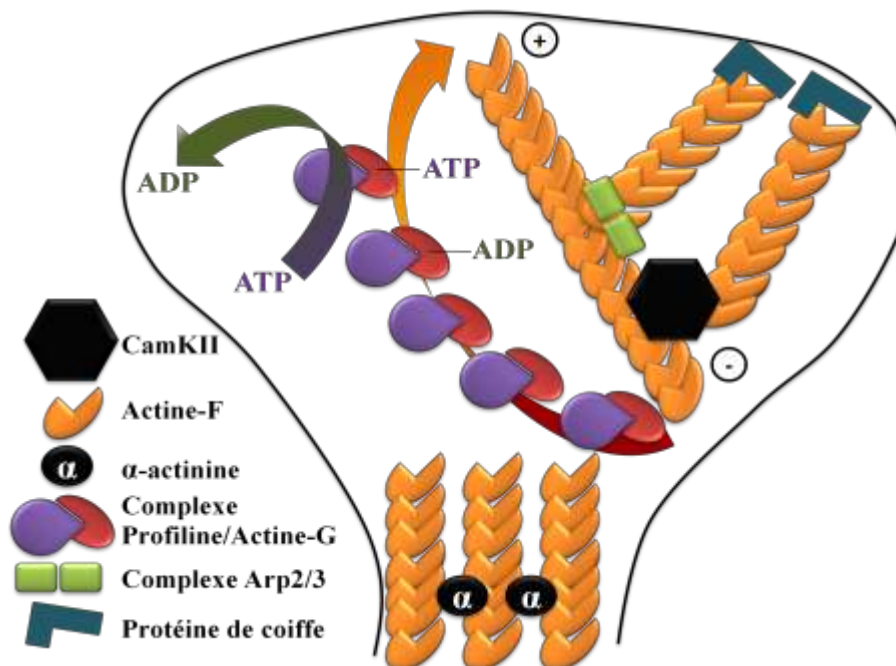


Figure 29 : La dynamique du réseau d'actine est finement régulée par les ABP.

La CAMKII et l' α -actinine permettent le rassemblement des filaments en faisceaux ou en réseau. La profiline maintient l'actine-G séquestrée à l'épine dendritique et favorise l'échange de son nucléotide. Le complexe Arp2/3 participe à l'élaboration du réseau branché de la tête en générant de nouveaux filaments sur d'autres déjà existants. La protéine de coiffe se fixe à l'extrémité (+) et empêche la polymérisation. Inspiré de Hotulainen et al., 2009; Hotulainen & Hoogenraad, 2010.

Il existe bien évidemment d'autres ABP que nous ne détaillerons pas ici, mais qui sont également impliquées dans les processus de plasticité. Dans le contexte d'induction de LTP, il faut comprendre que l'augmentation du nombre de récepteurs AMPA à la PSD (Hayashi et al., 2000 ; Bredt & Nicholl, 2003) doit pouvoir se faire sans encombrement ou perturbation stérique des éléments de la PSD. De même et toujours dans le but d'améliorer l'efficacité de la neurotransmission, les récepteurs au glutamate maximisent leur efficacité en étant orientés directement face à la zone active pré-synaptique, d'où la nécessité de reformer l'épine. Ces processus passent par des modifications de l'activité des ABP pour remodeler la forme de l'épine, ce qui conduit à un élargissement de la tête de l'épine dans les processus de plasticité (Okamoto et al., 2004). Par ailleurs, des études de microscopie à fluorescence super-résolution ou biphotonique proposent un modèle de dynamique de l'actine dans les épines basé sur deux sub-domaines distincts avec des caractéristiques de dynamique d'actine différentes (revu par Boyl & Witke, 2014) :

- le premier domaine serait constitué de protrusions péri-synaptiques (finger-like protrusions) émergeant du côté de la PSD (qui est un site de nucléation dans l'épine) et qui résultent d'une polymérisation rapide de l'actine indépendante des formines.

- le second domaine résulte d'une polymérisation de l'actine dépendante d'Arp2/3 à partir de domaines autour et sous la PSD.

Le trafic des récepteurs AMPA véhiculés par les protéines motrices de type myosine, les variations de volume de la tête de l'épine, l'ancrage des récepteurs ionotropiques du glutamate à la PSD, le maintien de la PSD face à l'élément pré-synaptique et les propriétés d'impédance du cou sont tous des points de contrôle critique dans l'établissement de la LTP et sont tous dépendants du cytosquelette d'actine et de sa conformation (Okamoto et al., 2004 ; Hotulainen & Hoogenraad, 2010 ; Anggono & Huganir, 2012). L'actine étant le composant essentiel du cytosquelette des épines, il est nécessaire de maintenir un réservoir d'actine monomérique, afin d'une part, de permettre la dynamique en treadmilling du filament, et d'autre part de pouvoir répondre à des besoins rapides de polymérisation des filaments. Ce processus fait notamment appel à une dissociation des monomères d'actine les plus âgés du filament, soit vers le bout (-). Parmi toutes les familles des ABP, celle des facteurs dépolymérisants de l'actine ADF/cofiline a été montrée comme particulièrement impliquée dans la dynamique de l'actine dans les épines et dans les remodelages morphologiques inhérents aux phénomènes de plasticité. Après avoir décrit la structure de la cofiline, nous étudierons son interaction avec le filament et son mode de désassemblage, puis sa régulation et son implication lors d'une induction de LTP. Il conviendra de noter qu'il existe quelques autres ABP impliquées dans le désassemblage du filament, mais de par sa grande implication dans ce processus vis-à-vis de l'actine post-synaptique, nous centrerons notre étude sur la cofiline.

3. L'ADF/Cofiline

La famille des ADF/Cofiline est une famille de protéines dépolymérisantes de l'actine, de 17-21 kDa. Les organismes unicellulaires ont un seul gène codant pour la cofiline alors que les organismes pluricellulaires ont plusieurs isoformes. Chez les mammifères il y a 3 isoformes différentes dans la famille des ADF/Cofiline (Hotulainen et al., 2005):

- l'ADF ou facteur dépolymérisant de l'actine (ou Destrine), qui est exprimé dans les cellules épithéliales et neuronales.
- la cofiline-1, qui est exprimée dans les tissus de l'embryon et l'adulte.
- la cofiline-2, qui est exprimée dans le tissu musculaire.

Ainsi l'ADF et la cofiline-1 sont les deux isoformes retrouvées dans le système nerveux. Néanmoins, il a été montré que l'ADF et la cofiline possèdent des fonctions analogues l'une de l'autre, mais que la cofiline-1 peut être exprimée jusqu'à 6 fois plus que l'ADF dans la lignée de neurones N2A (Hotulainen et al., 2005 ; Bernstein & Bamburg, 2010). De plus, la cofiline-1 compense les effets d'une inactivation de l'ADF à la synapse excitatrice (Görlich et al., 2011). Notre étude se concentrera donc essentiellement sur la cofiline-1, que nous appellerons plus simplement cofiline.

3.1. Structure et fonction

La structure de la cofiline a été résolue en 1997. On y retrouve notamment 5 ou 6 feuilletts β à l'intérieur, entourés de 4 à 5 hélices α (Fedorov et al., 1997 ; Figure 31).



Figure 31 : Structure tri-dimensionnelle de la cofiline.

Représentation 3D de la structure de la cofiline résolue par résonance magnétique nucléaire. La cofiline se compose de 5-6 feuilletts β et de 4-5 hélices α . D'après Fedorov. et al., 1997.

La première fonction de la cofiline, et également la plus connue, est d'induire la fragmentation et le désassemblage des filaments d'actine. Nous avons vu dans le sous-chapitre 1.2., que le nucléotide lié aux monomères d'actine-F est variable et dépend de « l'âge » du monomère (d'abord actine-ATP, puis actine-ADP-Pi en quelques secondes, puis actine-ADP en quelques minutes). La cofiline possède une affinité intrinsèque 40 fois moindre pour l'actine-ATP que l'actine-ADP, ce qui signifie que l'extrémité (+) du filament

n'est pas sujette à désassemblage par la cofiline (Suarez et al., 2011). La cofiline permet le désassemblage du filament, en partie en promouvant le relâchement du P_i de l'actine-ADP- P_i . Le relâchement du P_i peut se propager de manière allostérique jusqu'à 10 monomères voisins de la liaison actine-cofiline (Suarez et al., 2011) ce qui a pour effet de retrouver dans la cellule des filaments d'actine essentiellement composés d'actine-ADP et d'une coiffe actine-ATP et actine-ADP+ P_i . Le relâchement du P_i « vieillit prématurément » le filament et va accélérer sa dépolymérisation.

Le principal mécanisme de désassemblage de l'actine par la cofiline a été révélé il y a quelques années par des études biophysiques. La cofiline peut se lier à l'actine-ADP sur plusieurs dizaines voire centaines de monomères sur un même filament. On parle alors de segment décoré d'actine (McCullough et al., 2011). La liaison de la cofiline à l'actine change les propriétés biophysiques du filament, qui devient alors plus souple et flexible (De La Cruz & Gardel, 2015). Ainsi, à l'interface entre les segments de filament nu et décoré se produit une force de tension (McCullough et al., 2011) qui va induire une rupture irréversible des interactions actine-actine, et permettre ainsi le désassemblage du filament (Figure 32).

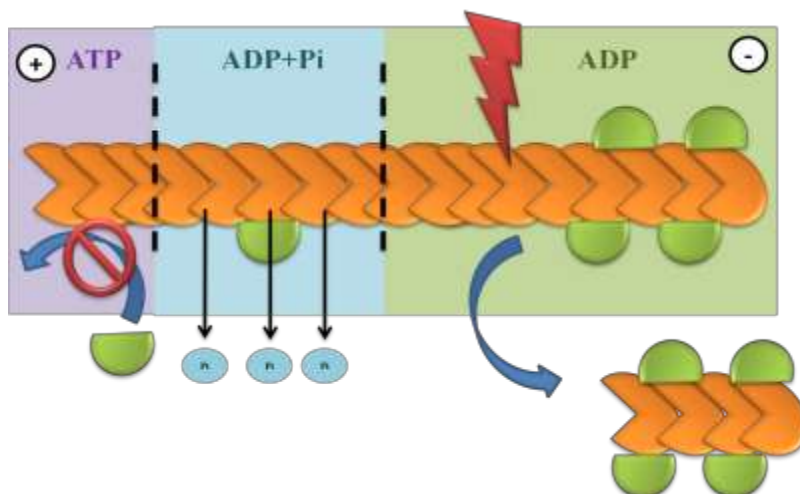


Figure 32 : L'interaction actine-cofiline dépend du nucléotide fixé à l'actine.

Schéma mécanistique montrant les effets nucléotide-dépendants de l'interaction actine-cofiline. La très faible affinité de la cofiline pour l'actine-ATP empêche sa fixation au bout (+) du filament. La cofiline peut davantage se lier à l'actine-ADP+ P_i , où la liaison catalyse la dissociation du P_i du monomère d'actine, et se propage jusqu'à 10 sous-unités d'actine voisines. La cofiline se lie bien plus à l'actine-ADP vers le bout (-), décore des tronçons du filament, et augmente ses propriétés flexibles. A l'interface entre segments de filaments nus et décorés se produisent des forces de tensions (éclair rouge), qui aboutiront à une fragmentation du filament. Inspiré de De La Cruz & Garde., 2015 ; Suarez et al., 2011.

Ainsi, l'activité dépolymérisante de la cofiline peut se faire de deux façons. En jouant sur les propriétés intrinsèques du filament, la cofiline catalyse la dissociation du P_i de l'actine-ADP- P_i , vieillit prématurément le filament et accélère ainsi la dissociation des monomères du filament (Blanchoin & Pollard, 1999). La cofiline peut également décorer des

segments d'actine et induire leur fragmentation, en jouant sur les propriétés de flexibilité du filament, différentes entre filaments décorés et nus.

En 2006, et à la grande surprise de la communauté scientifique, une nouvelle fonction et inverse de la précédente a été découverte. Andrianantoandro et Pollard ont testé *in vitro* les événements de dépolymérisation d'actine avec différentes concentrations appliquées de cofiline (Andrianantoandro & Pollard, 2006). L'étude a montré que, pour des concentrations en cofiline faibles (< 1 cofiline/100 monomères d'actine), cette dernière induit une dépolymérisation, alors que pour des concentrations élevées, la cofiline augmente la quantité d'actine polymérisée. Si cette nouvelle faculté de la cofiline est admise, les mécanismes intrinsèques sont eux toujours sujets à débat.

Deux hypothèses expliquent le pouvoir nucléateur de la cofiline envers l'actine. La première hypothèse se base sur les propriétés de liaison de la cofiline à l'actine-G, et stipule que les complexes actine-G-cofiline pourraient s'assembler entre eux et créer un trimère d'actine et donc une amorce de filament (Andrianantoandro and Pollard, 2006). L'autre hypothèse stipule que la décoration de segments actine-ADP par la cofiline permet comme nous l'avons vu de détacher ce segment du reste du filament, et de le maintenir stabilisé. Ce segment isolé présenterait donc une nouvelle extrémité (+) susceptible de polymériser et de créer un nouveau filament (Figure 33). Ces théories sont encore débattues, mais rien n'affirme qu'elles ne puissent pas se produire de manière concomitante. L'information essentielle reste néanmoins que la concentration en cofiline dans un milieu ou un compartiment cellulaire régit la nature de son mode d'action.

De manière de plus en plus surprenante, d'autres fonctions cellulaires ont été attribuées à la cofiline. L'actine a été montrée comme impliquée comme régulateur d'expression génique mais est déficiente en signal de localisation nucléaire, à l'inverse de la cofiline. Le complexe actine-cofiline pourrait permettre la translocation de l'actine dans le noyau où cette dernière serait impliquée par exemple dans le remodelage de la chromatine ou encore la formation de complexes ribonucléoprotéiques (Zheng et al., 2009). La cofiline a également été montrée comme participant au processus d'apoptose. Elle est impliquée dans l'ouverture du pore de transition de la perméabilité mitochondriale (MPTP) et donc, dans le relâchement du cytochrome C dans le cytoplasme et l'induction *in fine* de l'apoptose (Bernstein and Bamburg, 2010). Il y a donc fort à parier que de plus en plus de fonctions cellulaires seront attribuables ou en partie dépendantes de la cofiline, ce qui fait d'elle un élément essentiel dans de plus en plus de processus cellulaires, non-restreints à des réarrangements du cytosquelette d'actine.

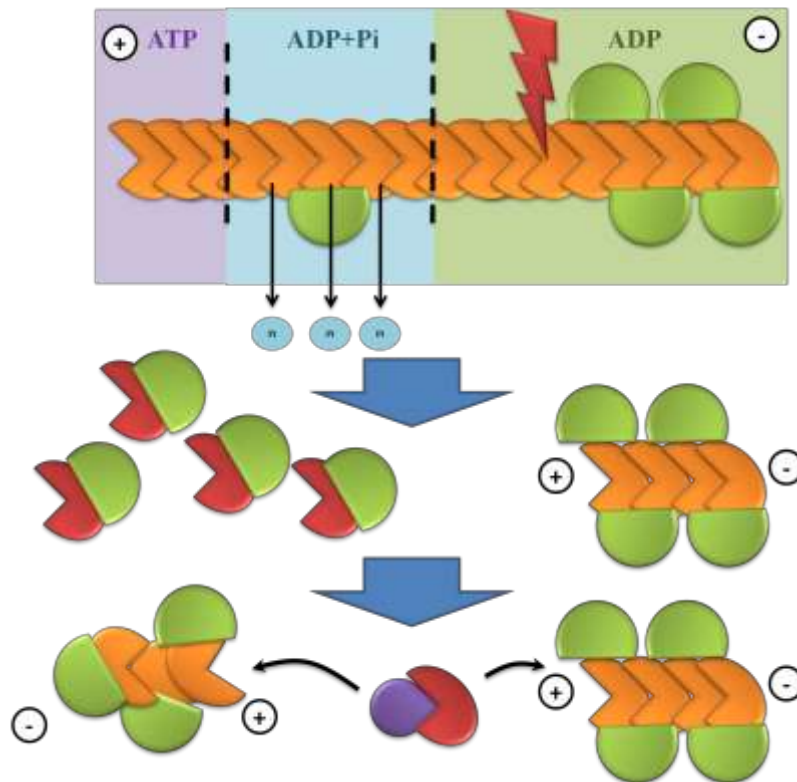


Figure 33 : Les 2 hypothèses de nucléation de l'actine par la cofiline.

Schéma mécanistique montrant les théories de la polymérisation cofiline-dépendante de l'actine. La première hypothèse stipule que les monomères désassemblés du filament ou du segment décoré sont liés à la cofiline (milieu gauche). La cofiline serait alors capable de rassembler dans une configuration inconnue, deux ou trois monomères et générer un point de nucléation (bas gauche) avec peut-être une action partenaire de la Profiline (goutte mauve, milieu bas), ce qui permettrait la génération d'un nouveau filament. Contrairement à l'hypothèse de nucléation, l'hypothèse de fragmentation suggère que les segments d'actine décorés de cofiline et décrochés du filament originel sont stabilisés (milieu droite), et représentent autant de nouveaux petits filaments, ayant chacun une extrémité (+) libre et susceptibles de constituer de nouveaux sites d'allongement de filaments d'actine (milieu bas). Inspiré de Bernstein & Bamburg, 2011 ; Suarez et al., 2011 ; De La Cruz & Gardel, 2015.

3.2. Les régulateurs de la cofiline

Le contrôle du recrutement et de l'activité de la cofiline est vital. La délétion de la cofiline est létale chez l'embryon de souris (Gurniak et al., 2005), d'où l'importance de la cofiline et de sa régulation. Il existe différents moyens de modulation de l'activité de la cofiline par la cellule. La cofiline peut-être inhibée par liaison au lipide membranaire phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ou PIP₂ (Frantz et al., 2008 ; Mizuno, 2013), par une alcalinisation du pH intracellulaire (Bernstein et al., 2000) par liaison avec la cortactine (Oser et al., 2009) mais aussi et surtout, par phosphorylation sur son résidu sérine 3. De par son

implication drastique dans les processus de migration cellulaire, de morphogénèse, mais aussi de plasticité synaptique, nous focaliserons notre étude sur la régulation par phosphorylation de la cofiline.

Lorsque la cofiline est phosphorylée sur la sérine 3, un pont salin se forme entre la sérine et les résidus lysine126 et 127, qui sont impliqués dans le domaine de liaison à l'actine. Ainsi, et indépendamment de sa concentration, la phosphorylation en Sérine 3 empêche toute interaction avec l'actine (Bernstein and Bamburg, 2010). La phosphorylation de la cofiline se fait majoritairement par l'intermédiaire de 4 protéines différentes chez les mammifères : les TESK 1 & 2 ou protéines kinases relatives aux testicules 1 & 2 et les LIM-Kinase (Lim-k) 1 & 2 ou Protéines kinases à domaine LIM (Structure en doigt-Zinc originellement trouvée chez 3 facteurs de Transcription différents). La Lim-k1 est considérée comme majoritaire dans le cerveau (Foletta et al., 2004).

A l'inverse, l'activation de la cofiline peut également se faire par déphosphorylation en sérine 3 par l' haloacide dehalogenase chronophine (Huang et al., 2006) et par la famille des Slingshot (SSH) comprenant SSH1, 2 & 3. Les protéines phosphatases 1 et 2A (PP1 & PP2A) peuvent également déphosphoryler la cofiline (Mizuno, 2013 ; Figure 34).

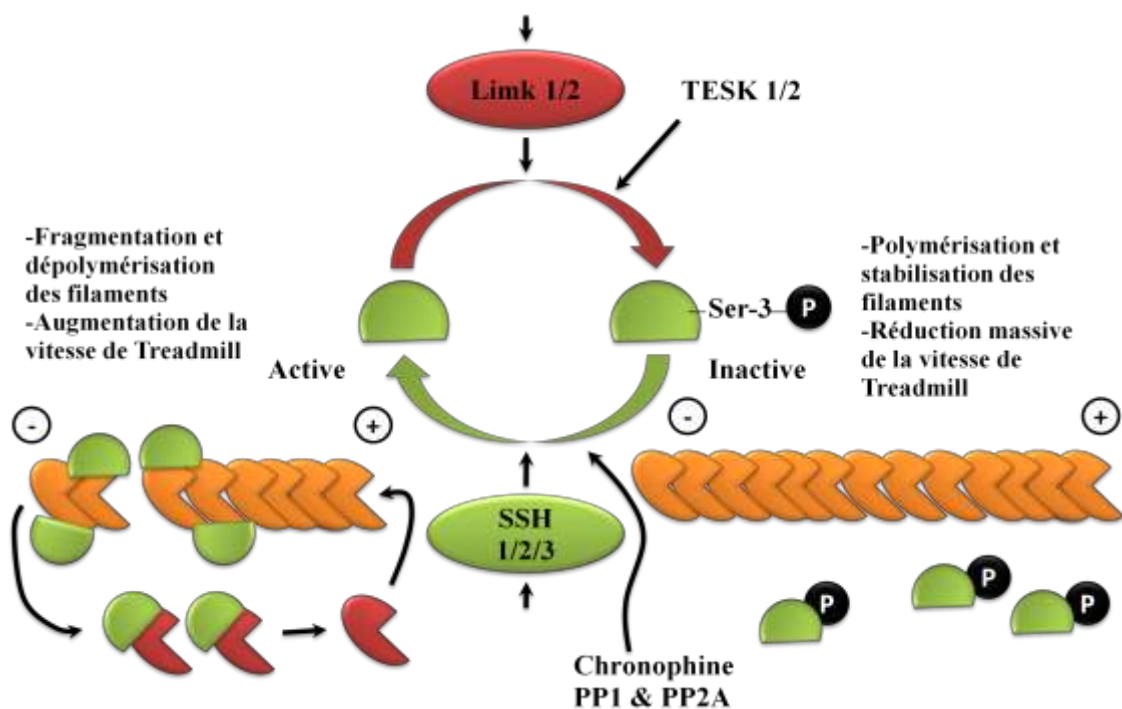


Figure 34 : Les différents régulateurs de la phosphorylation en Ser-3 de la cofiline.

Schéma montrant les modulateurs cellulaires de la cofiline. La cofiline active fragmente et dépolymérise le filament d'actine, augmentant le pool d'actine-G et le nombre d'extrémités (+) et ainsi le nombre de filaments. Sa phosphorylation par la Lim-kinase ou la TESK la découple de l'actine : les filaments se stabilisent et s'allongent. Sa réactivation /déphosphorylation par SSH, Chronophine, PP1 ou PP2A permet de nouveau l'interaction avec le filament. Inspiré de Bernstein & Bamburg, 2010 ; Mizuno, 2013.

Au niveau de l'épine dendritique, la régulation du cytosquelette d'actine est un point de contrôle critique dans l'établissement de modifications durables comme celles rencontrées lors du processus de LTP. La régulation de la cofiline par Lim-k1 est essentielle à la synapse, puisqu'un certain nombre de désordres cognitifs relatifs à l'autisme sont dépendants d'une dérégulation de la Lim-k1 (Görlich et al., 2011), et que d'une manière plus générale, la dérégulation de la cofiline perturbe la neurotransmission excitatrice glutamatergique (Hotulainen et al., 2009).

3.2.1. Régulateurs de la cofiline : les protéines G

L'actine est très dynamique dans l'épine, et régit les changements morphologiques inhérents à une stimulation post-synaptique, notamment par voie calcium dépendante (Star et al., 2002). Dans ce cas, on peut se demander quels sont les mécanismes moléculaires permettant le lien entre réarrangement conformationnel d'actine, et influx de calcium. Dans tous les différents types de cellules et tous les autres processus cellulaires actine-dépendants, la signalisation par les protéines G est essentielle dans ce processus.

Les protéines G monomériques (ou GTPases) sont des interrupteurs signalétiques moléculaires d'un poids moléculaire médian de 21 kDa, qui tiennent leur nom de leur capacité à lier un nucléotide de type guanosine di ou triphosphate. La nature du nucléotide lié à la protéine G définit son état d'activation : inactif avec du GDP et actif avec du GTP (Kiraly et al., 2010). Les protéines G les plus étudiées, notamment dans les phénomènes de plasticité sont celles de la famille Rho (Rac Homologous), comprenant notamment RhoA, Rac1 et Cdc42 (De Curtis, 2008 ; Kiraly et al., 2010). L'activité des protéines G, c'est-à-dire la nature de leur nucléotide lié, est finement régulée par les facteurs d'échange de guanosine ou GEF qui activent les protéines G en catalysant l'échange du GDP en GTP, et par les facteurs d'activation d'activité GTPasique ou GAP, qui catalysent l'hydrolyse du GTP en GDP, et inactivent ainsi la protéine G (Tolias et al., 2011 ; Figure 35).

Les GEFs sont maintenus séquestrés à la PSD notamment grâce à la présence de domaines PDZ qui leur permettent d'interagir et de s'ancrer à la PSD via les récepteurs AMPA ou NMDA ou encore PSD-95 (Tolias et al., 2011 ; Kiraly et al., 2010 ; Penzes et al., 2001). D'autres encore possèdent un domaine « Sec14p » leur permettant d'interagir avec les lipides membranaires de type PIP₃ ou PIP₂ (Kiraly et al., 2010). Plus simplement, ils peuvent être recrutés lors d'une activation synaptique (Muly et al., 2008).

Les Rho-GEF sont indispensables aux remodelages actine-dépendants lors d'une induction de LTP. Leur activation par phosphorylation ainsi que leurs substrats est notamment NMDAR-Ca²⁺-CamKII dépendante (Xie et al., 2007 ; Kiraly et al., 2010 ; Lemtiri-Chlieh et al., 2011 ; Murakoshi et al., 2011), mais peut se faire également par activation de la PKC (Kiraly et al., 2010). Les GEFs les plus impliqués dans les processus de plasticité sont Kalirin7 et Tiam1 pour Rac1, β-PIX pour Cdc-42, Lfc et l'ephexine pour RhoA (Kiraly et al., 2010 ; Tolias et al., 2011).

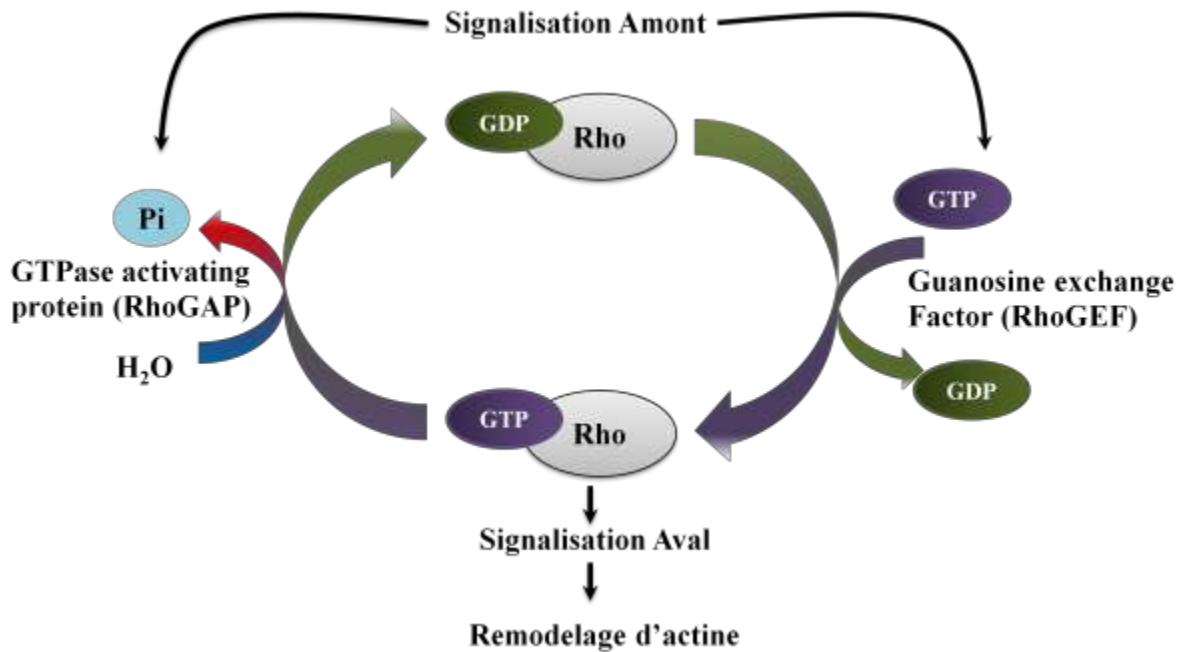


Figure 35 : Cycle activateur et inhibiteur des Rho GTPases.

Schéma mécanistique de l'activation/inactivation des Rho GTPases. L'activation se fait par échange du nucléotide GDP en GTP par l'intermédiaire des RhoGEFs. Les protéines G activées transduisent les signaux à leurs substrats et induisent un remodelage d'actine. L'hydrolyse du GTP en GDP catalysée par les RhoGAP ramène les protéines G en conformation inactive. Adapté de Luo, 2002.

3.2.2. Substrats des Rho-GTPases

Dans les processus de plasticité morphologique, la cofiline et le complexe Arp2/3 sont parmi les ABP induisant les changements les plus drastiques vis-à-vis de l'actine, et leur régulation par les protéines G sont les voies de signalisation les plus étudiées. Lors d'une induction de LTP, l'activation de Cdc42 va permettre à la GTPase de se lier à N-WASP et de l'activer. N-WASP activera à son tour le complexe Arp 2/3 afin de permettre l'établissement d'un réseau branché de filaments. (Wegner et al., 2008; Auer et al., 2011 ; figure 36). Rac1 participe également à ce phénomène par l'intermédiaire d'une liaison avec WAVE (Auer et al., 2011). A l'inverse, lors d'une induction de LTD, Arp2/3 est inhibé par PICK1, ce qui favorise l'internalisation des AMPAr (Rocca et al., 2013).

Au niveau de la régulation de l'activité de la cofiline par les Rho GTPases, les protéines PAK 1 & 3 (p21-Activated Kinase) sont impliquées dans la phosphorylation de la cofiline. A l'état de repos, PAK est liée en homodimère. L'activation de Rac1 ou Cdc42 par fixation de GTP permet leur liaison à l'homodimère. Cette interaction va déstabiliser le complexe et libérer les deux homo-kinases sous forme active qui vont à leur tour phosphoryler la lim-k1 sur son résidu thréonine 508 et l'activer (Koth et al., 2014) ce qui augmente grandement son activité kinase (Edwards et al., 1999). De manière parallèle à l'activation de RhoA en

contexte d'induction de LTP par son RhoGEF, Lfc va permettre l'activation de Rock ou Rho GTPase associated kinase, notamment RockII, l'isoforme la plus abondante dans le cerveau (Salminen et al., 2008). RockII activée va également phosphoryler la Lim-k1 sur le même résidu (Ohashi et al., 2000; Muly et al., 2008 ; Auer et al., 2011 ; figure 36). L'activation de Lim-k1 par ces voies parallèles va conduire à une phosphorylation de la cofiline en sérine-3 et donc à sa désactivation. Ainsi, les processus de remodelage lors d'une LTP vont conduire à l'activation de ces voies signalétiques, ce qui aura pour effet de réarranger le cytosquelette d'actine dans l'épine, notamment l'extension et le maintien d'un réseau branché par l'activation d'Arp2/3 et la stabilisation et l'élongation des filaments d'actine par inhibition de la cofiline (Chen, et al., 2007).

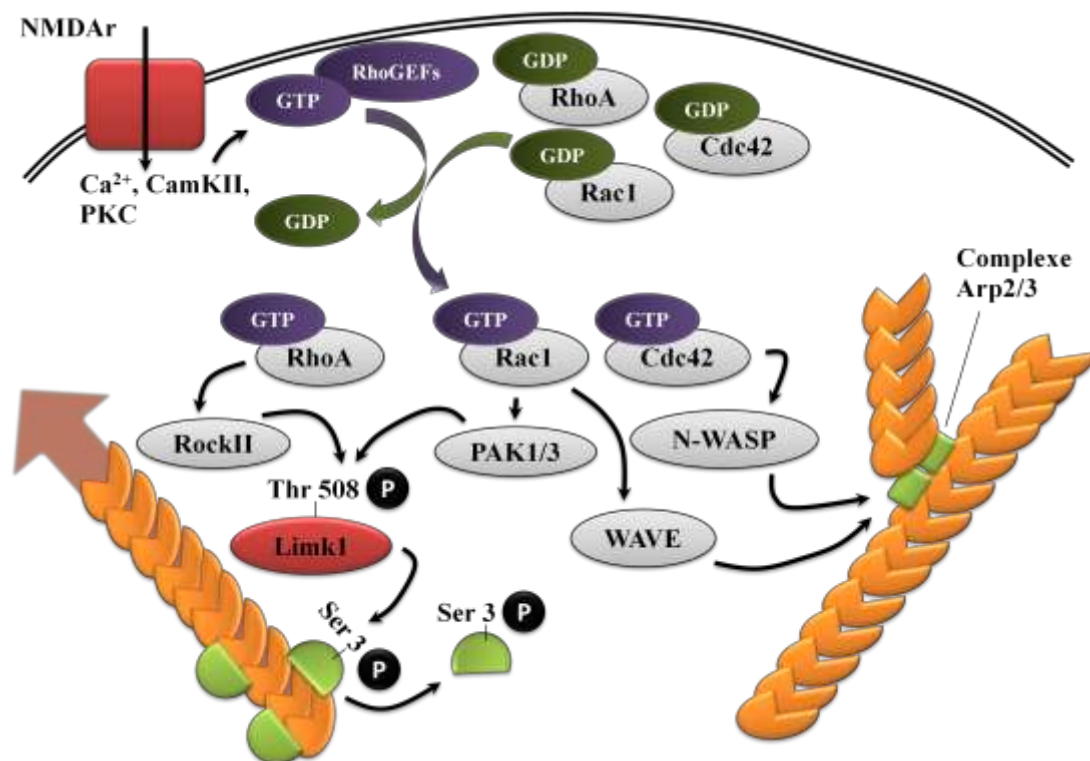


Figure 36 : Les RhoGTPases sont impliquées dans les remodelages de l'épine activité-dépendants.

Schéma mécanistique non-exhaustif montrant les voies de signalisation impliquées dans le remodelage de l'actine synaptique. L'activation de PKC et notamment de CamKII va induire l'activation des RhoGEFs qui vont échanger le nucléotide de RhoA, Rac1 et Cdc42. Leur activation induira la formation de nouveaux filaments par Arp2/3, lui-même activé par N-WASP et WAVE. En parallèle, PAK et Rock vont phosphoryler la Lim-kinase en thréonine 508, lui permettant elle-même de phosphoryler la cofiline en sérine3. La cofiline se détache ainsi du filament, ce qui induit de ce fait une stabilisation et un allongement progressif des filaments. Inspiré de Luo, 2002.

Il est possible de moduler pharmacologiquement ces voies régulatrices et notamment celles de la cofiline. Le fasudil (Fasudil hydrochloride) ou HA1077 est un inhibiteur notable de la phosphorylation de Rock et était testé à l'origine comme anticancéreux (Shirotani et al., 1991). Son utilisation s'est diversifiée dans des études fondamentales sur l'implication de la voie RhoA/Rock/Lim-kinase dans la régulation de l'actine, notamment en contexte neurologique et neuropathologique (Kitaoka et al., 2004 ; Couch et al., 2010). Le fasudil fera l'objet d'un versant de notre étude.

4. Couplage moléculaire des modifications morphologiques et fonctionnelles

Pour reprendre les notions les plus importantes des chapitre 2 & 3, nous avons vu que l'actine-F est le principal élément du cytosquelette des épines (Landis & Reese, 1983) et possède des propriétés dynamiques (Star et al., 2002) qui régissent la forme de l'épine. Les récepteurs ionotropiques du glutamate AMPA et NMDA font face à l'élément pré-synaptique au niveau de la PSD. Le processus de LTP, qui consiste en une activation synaptique puissante et répétée regroupe l'ensemble des processus cellulaires et moléculaires conduisant aux processus mnésiques. L'induction de LTP se caractérise notamment par une augmentation et une modification des récepteurs AMPA à la PSD (Derkach et al., 1999 ; Hayashi et al., 2000), mais aussi par un accroissement du volume de l'épine dû à une polymérisation accrue d'actine-F (Okamoto et al., 2004). L'induction de LTP conduit à un recrutement et une activation de protéines kinases comme la PKC et la CamKII (Malinow et al., 1988 ; Roberson & Sweatt, 1996 ; figure 37). Ces kinases sont responsables de l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA à la PSD. Ce mécanisme implique la fusion de vésicules à récepteurs AMPA avec la membrane plasmique post ou péri-synaptique, mécanisme Erk-dépendant (Hayashi et al., 2000 ; Park et al., 2004 ; Patterson et al., 2010).

CamKII et PKC peuvent également induire l'activation de la stargazine, protéine associée au récepteur AMPA qui se fixe à PSD-95 et maintient ainsi l'AMPA séquestré à la PSD (Lisman et al., 2012). Plus tardivement, Erk est transloquée dans le noyau et active l'expression de gènes « mnésiques » (Davis et al., 2000). Ainsi, les aspects fonctionnels de la LTP se caractérisent par une augmentation des constituants de la PSD. Ils requièrent en conséquence un remodelage de l'épine par l'actine (Fukazawa et al., 2003), pour une bonne insertion des nouveaux composants sans contrainte stérique et face à l'élément pré-synaptique, mais également pour assurer l'acheminement des cargos vésiculaires jusqu'à la PSD. Les processus d'élargissement de l'épine sont donc essentiels, actine-F dépendants, et sont notamment déclenchés de manière PKC ou CamKII dépendante (Figure 37).

Ces kinases notamment activées par l'influx de calcium NMDA-dépendant (Xie et al., 2007 ; Kiraly et al., 2010 ; Murakoshi et al., 2011) vont induire l'activation des RhoGEF qui vont à leur tour activer les Rho GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42. L'activation de Rac1 et Cdc42 permet l'activation et le recrutement d'Arp2/3, qui pourra générer de nouveaux

filaments d'actine à partir d'anciens et créer ainsi un réseau d'actine branché nécessaire à l'élargissement de la tête de l'épine (Hotulainen et al., 2009). Rac1 et RhoA vont induire la phosphorylation de la Lim-k1 en threonine 508 via PAK1/3 et RockII (Edwards et al., 1999 ; Ohashi et al., 2000 ; Koth et al., 2014). La Lim-k1 va ensuite phosphoryler la cofiline sur la sérine3, et ainsi l'inactiver. L'inactivation de la cofiline induit une stabilisation et un allongement progressif des filaments d'actine (Figure 37). Ce phénomène fonctionne de manière inversée dans le processus de dépression à long terme (LTD). Il fait notamment appel à l'activation de protéine phosphatases comme PP1 ou PP2A et se caractérise par une diminution de la taille de la tête et de la PSD (Zhou et al., 2004). La réduction de la taille de l'épine est dépendante d'une dépolymérisation de l'actine-F par la cofiline, qui est elle même déphosphorylée/activée par la phosphatase slingshot (Mizuno, 2013).

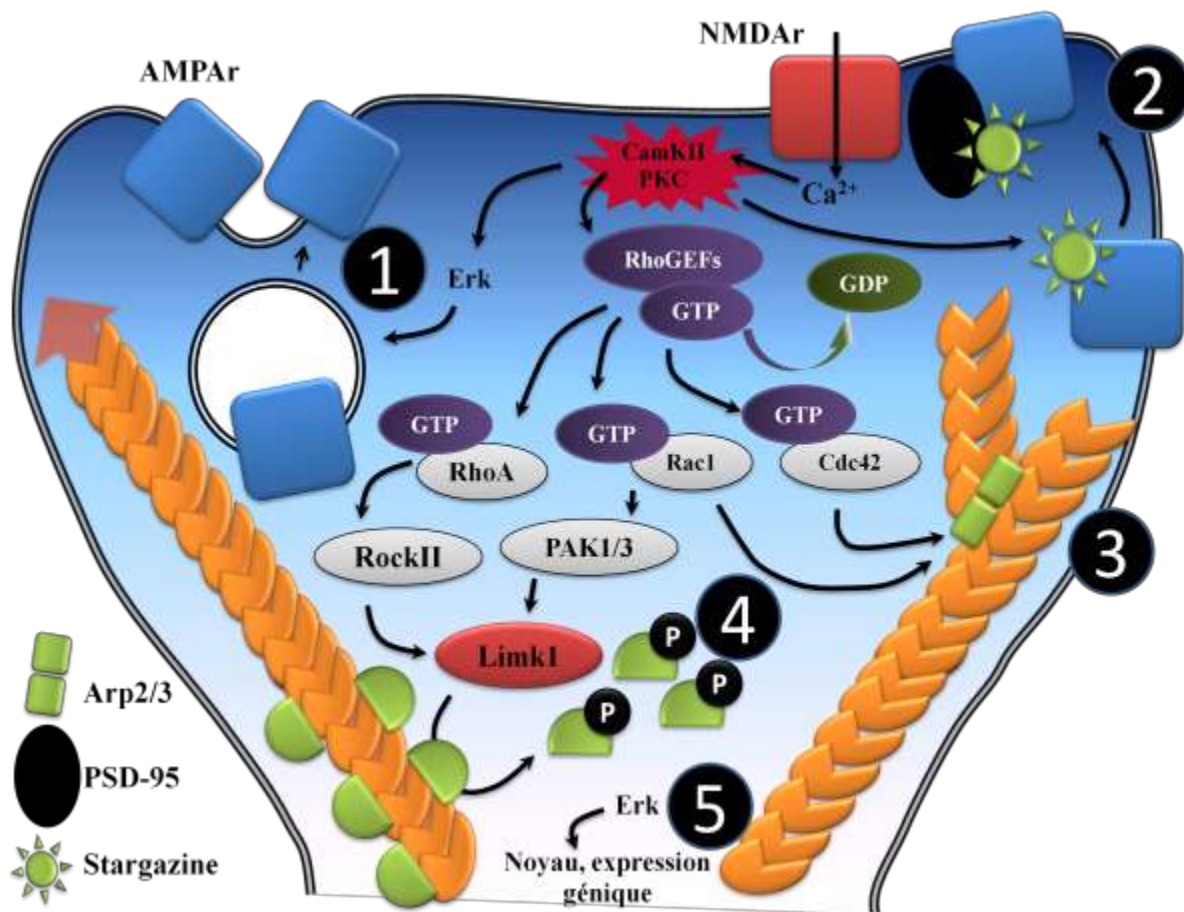


Figure 37 : Les protéines kinases PKC et CamKII impliquées dans les remodelages morphologiques et fonctionnels lors d'une LTP.

Schéma récapitulatif simplifié montrant l'implication de PKC et CamKII dans les processus fonctionnels de la LTP : (1 & 2) : l'exocytose Erk-dépendante des AMPAr ou leur adressage à la PSD (zone bleu foncé) par activation de la stargazine. PKC et CamKII activent également la voie des Rho GTPases, créant le réseau branché par l'activation d'Arp2/3 (3). RhoA et Rac1 phosphorylent la Lim-k1 par Rock et PAK. (4) La lim-k1 inactive la cofiline par phosphorylation, permettant l'allongement des filaments d'actine. Dans les phases plus tardives (5), Erk active dans le noyau l'expression de gènes associés à la mémoire. Inspiré de Mizuno, 2013 ; Lisman et al., 2012 ; Luo, 2002.

Le trafic des récepteurs AMPA véhiculés par les protéines motrices de type myosine, les variations de volume de la tête de l'épine, l'ancrage des récepteurs ionotropiques du glutamate à la PSD et le maintien de la PSD face à l'élément pré-synaptique sont tous des points de contrôle critiques dans l'établissement de la LTP et sont tous dépendants du cytosquelette d'actine et de sa conformation (Okamoto et al., 2004 ; Hotulainen & Hoogenraad, 2010 ; Anggono & Huganir, 2012). L'actine n'est donc pas un constituant passif de l'épine mais bel et bien un élément moteur des processus morphologiques et fonctionnels de la plasticité.

Il est important de garder en mémoire que les processus cellulaires à l'origine des processus mnésiques sont bien plus variés que ceux décrits ici, mais ne seront pas abordés dans cette étude. L'induction de mémoire requiert donc au niveau moléculaire une machinerie protéique complexe et hautement régulée. Or ce sont les processus mnésiques qui font notamment défaut aux patients atteints de la MA. Au cours du prochain chapitre, nous allons discuter des avancées récentes quant aux perturbations des processus expliqués ci-dessus dans la MA.

Chapitre 4 : synaptotoxicité et A β

1. Une atteinte de la signalisation NMDAr-dépendante

Le peptide Béta-amyloïde sous forme fibrillaire constitue les plaques séniles, l'un des deux marqueurs histologiques de la MA. Les oligomères d'A β (A β) sont un état intermédiaire d'agrégation de l'A β en fibrilles, et présentent un caractère synaptotoxique. Ils peuvent perturber les différents processus de plasticité que nous avons présentés dans les chapitres 2 & 3. Ces altérations surviennent indépendamment de la nature variable des oligomères utilisés, qu'ils soient d'origine naturelle, c'est-à-dire extraits de cerveaux de patients atteints de MA, d'origine synthétique, ou encore sécrétés par des cellules surexprimant les formes mutées de l'APP (Snyder et al., 1994 ; Lacor et al., 2004).

Les travaux de Walsh et collaborateurs ont montré que l'A β perturbe/inhibe le processus de LTP (Walsh et al., 2002). Depuis, plusieurs hypothèses tentent d'expliquer les mécanismes moléculaires des perturbations synaptiques par l'A β . Selon une première théorie, l'inhibition de la LTP serait un phénomène conséquent d'une internalisation anormale des AMPAr et NMDAr induite par l'A β (Hsieh et al., 2006 ; Snyder et al., 2006). Ces travaux sont soutenus par ceux de Shankar et collaborateurs qui montrent une activation de la calcineurine ou PP2B par influx de calcium intracellulaire, qui induirait l'endocytose des récepteurs (Shankar et al., 2007). Il est important de noter que l'A β perturbe également la neurotransmission inhibitrice en provoquant également l'endocytose des récepteur GABA_A (Ulrich, 2015).

Une autre hypothèse met en avant une activation excessive des NMDAr, qui conduirait à des dysfonctionnement synaptiques par surcharge calcique mitochondriale (Ferreira et al., 2015) et à des phénomènes excitotoxiques. Les travaux de Balietti et collaborateurs ont auparavant montré une altération de la dynamique, du transport et de la physiologie des mitochondries chez la souris Tg2576 (Balietti et al., 2013). Des données récentes montrent l'implication de l'A β dans ce phénomène, qui serait également dépendant d'une dérégulation des stocks calciques du réticulum endoplasmique lisse (Ferreira et al., 2015). Pourtant, une récente étude démontre que la toxicité de l'A β serait dépendante du NMDAr lui-même plutôt que du flux calcique, et met notamment en jeu les récepteurs NMDA métabotropiques (Birnbaum et al., 2015). En effet, sur culture de neurones d'hippocampe, l'ajout d'AP5 (un inhibiteur non-selectif des récepteurs NMDA) inhibe les processus de plasticité, notamment la phosphorylation d'Erk, mais pas l'ajout du chélateur calcique BAPTA, ni le traitement aux bloqueurs du canal NMDA, le MK-801 ou la memantine (Birnbaum et al., 2015).

D'autres études ont montré une activation plus spécifique des récepteurs NMDA extra-synaptiques vs post-synaptiques par l'A β (Bordji et al., 2010; Li et al., 2011; Kervern et al., 2012). Cette activation serait responsable de la surcharge calcique et des dysfonctionnements mitochondriaux qui en découlent, mais également d'un métabolisme préférentiel de l'APP

vers la voie amyloïdogénique (Bordji et al., 2010). Cette théorie est encouragée par une très récente étude, montrant un rôle inhibiteur de l'A β sur la recapture du glutamate, qui pourrait alors déborder de la fente synaptique (phénomène de « glutamate spillover ») et activer les NMDAr péri- ou extra-synaptiques, et induire des cascades de signalisation pro-apoptotiques (Varga et al., 2015 ; Li et al., 2011). Une libération excessive de glutamate par les astrocytes pourrait également participer à ce phénomène (Talanta et al., 2013).

Lorsque des études se penchent sur une induction possible de LTD par l'A β , les résultats divergent. Dans certains cas, l'A β est responsable de l'induction de LTD dans la région CA1 de l'hippocampe et d'une manière NMDAr dépendante (Cheng et al., 2009). De plus, Kervern et collaborateurs (2012) ont montré par électrophysiologie que le niveau de stimulation nécessaire pour induire la LTP est plus élevé dans des tranches aiguës d'hippocampe de souris exposées à l'A β , démontrant ainsi l'effet facilitateur de l'A β sur la LTD. A l'inverse, l'A β a également été montré comme n'ayant pas d'effet dans l'induction de LTD (Raymond et al., 2003). Ainsi, l'A β apparaît plutôt comme élément catalyseur de la LTD qu'initiateur. Cette facilitation pourrait se faire par l'intermédiaire de la calcineurine, puisque des niveaux anormalement élevés de PP2B ont été retrouvés chez des patients atteints de MA (Liu et al., 2005).

Le rôle de l'A β dans la synaptotoxicité fait donc toujours l'objet de débats. Les différents résultats et théories établis à ce sujet peuvent s'expliquer par la grande variété de modèles utilisés, mais également des préparations d'oligomères. En utilisant des oligomères isolés à partir de cerveaux de patients atteints de la MA, les travaux de Shankar et collaborateurs montrent que les dimères d'A β présentent un pouvoir particulièrement synaptotoxique (Shankar et al., 2008). Au contraire, les travaux de Lesné et collaborateurs mettent davantage en avant les dodécamères d'A β ou A β -star dans la synaptotoxicité et l'inhibition de la LTP (Lesné et al. 2006), une espèce isolée à partir de cerveaux de malades. En travaillant avec des surnageants de cellules 7PA2 surexprimant l'APP humain muté, Welzel et collaborateurs (2014) ont identifié un nouveau peptide produit par le métabolisme de l'APP, plus long au niveau de la région N-ter et donc nommé NTE-A β (N-Terminal Extended A β). Le NTE-A β se présente sous la forme de dimère, d'un poids de 8,5 kDa, qui possède un caractère synaptotoxique (Welzel et al., 2014). Une autre étude récente a montré que parmi toutes les formes solubles d'A β extraites à partir de cortex pré-frontaux d'humains malades et de cerveaux entiers de souris Tg2576, il existe des formes de haut poids moléculaire interagissant spécifiquement avec la protéine du prion (PrP^c). La présence de ces oligomères nommés PrP^c-interacting A β et leur concentration corrèle de manière proportionnelle avec les déficits d'apprentissage chez la souris Tg2576. Les PrP^c-interacting A β pourraient donc constituer un nouvel index d'évolution de la maladie (Kostylev et al., 2015).

Si l'A β est maintenant bien connu pour ses capacités à inhiber la LTP et à faciliter la LTD, les mécanismes moléculaires engagés sont donc toujours sujets à débat mais impliquent

régulièrement des perturbations de la signalisation NMDAr-dépendante. Les données, bien que contradictoires montrent que les oligomères de haut et bas poids moléculaires peuvent induire de tels effets. Mais la synaptotoxicité de l'A β a également été étudiée sur le plan morphologique et plusieurs voies de signalisation ont été impliquées dans ce contexte.

2. Des altérations actine-dépendantes de la morphologie des synapses

Tout comme les atteintes fonctionnelles, les atteintes morphologiques sont liées à la présence d'A β au niveau synaptique (voir pour revue Penzes & Vanleeuwen, 2011; Tu et al., 2014). On retrouve ainsi une diminution de la densité synaptique chez les patients atteints de la MA, mais également dans des modèles transgéniques (Knobloch & Mansuy, 2008). La réduction de la densité synaptique est liée à la présence d'A β (Shankar et al., 2007; Lacor et al., 2007). Comme nous l'avons vu au chapitre 3, la cofiline est un élément essentiel dans la régulation du cytosquelette d'actine, qui est responsable de la forme de l'épine (Star et al., 2002). La cofiline est très étudiée dans le cadre de la MA, car elle fut mise en évidence dans des agrégats d'actine filamenteuse intracellulaires nommés corps de Hirano, que l'on retrouve dans le cerveau des patients atteints de MA. Elles s'apparentent à des fibres de stress, contenant des protéines se liant à l'actine et notamment de la cofiline sous forme active (Knobloch & Mansuy, 2008).

L'une des principales hypothèses de la synaptotoxicité explique que l'effondrement synaptique par l'A β se fait de façon NMDAr-dépendante (Shankar et al., 2007). Ce processus passerait notamment par une activation de la calcineurine qui activerait à son tour la cofiline et entraînerait ainsi une perte synaptique par dépolymérisation progressive de l'actine filamenteuse (Shankar et al., 2007). Par ailleurs, la signalisation activatrice en amont de la cofiline a également été étudiée dans la MA. Dans l'hippocampe de patients malades, et chez la souris Tg2576, le niveau de PAK et de phospho-PAK est réduit (Zhao et al., 2006). De plus, le niveau de kalirin (qui est un RacGEF) est réduit dans l'hippocampe de patients malades, ce qui soutient l'hypothèse de l'hypoactivation de la voie karilin/Rac/PAK/Lim-k/cofilin, et donc d'une hyperactivation de la cofiline dans les phénomènes de perte synaptique (Youn et al., 2007). Un autre mécanisme synaptotoxique cofiline-dépendant démontré récemment stipule que les oligomères peuvent activer la cofiline par voie intégrine-dépendante, et que cette dernière déclenche des mécanismes pro-apoptotiques par dysfonctionnement mitochondrial (Woo et al., 2015).

Pourtant, des études *in vitro* ont montré que l'ajout d'A β sur culture primaire de neurones d'hippocampe induit une activation de PAK1 qui active à son tour la Lim-k1 (Zhao et al., 2006). Ces résultats sont similaires à ceux d'Heredia et collaborateurs, qui montrent sur le même modèle que l'application d'A β fibrillaire induit une activation de la Lim-k1 qui inactive la cofiline (Heredia et al., 2006). L'augmentation de la phosphorylation de la Lim-k1 a également été observée dans le cerveau de patients malades (Heredia et al., 2006).

La Lim-k1 est principalement régulée par PAK et par Rock. La voie RhoA-Rock est également altérée dans la MA. L'expression et l'activité de RockII est augmentée dans les phases asymptomatiques et symptomatiques de la MA (Herskowitz et al., 2013). En effet, RockII est impliquée dans le processing amyloïdogénique de l'APP par phosphorylation de ce dernier en threonine 654 et l'inhibition pharmacologique de RockII est neuroprotective (Herskowitz et al., 2013). RockII est également impliquée dans la MA, au travers de processus neuro-dégénératifs liés à ses substrats comme CRMP-2 ou Collapsin Response Mediator Protein-2 (Ma et al., 2012). Pourtant, les effets de RockII sur la régulation de l'actine dans le cadre de la MA n'ont pas encore été étudiés, et ce malgré son implication dans la phosphorylation de la cofiline lors des processus d'induction de LTP (Chen et al., 2007 ; Rex et al., 2009).

Une étude de Barone et collaborateurs parue l'an dernier a montré, au contraire des données précédentes suggérant une hyperactivité de la cofiline, une phosphorylation accrue de la cofiline1 (i.e. suggérant une hypoactivité) médiée par la Lim-k1 et slingshot dans le cortex frontal de patients malades. Ils retrouvent également cette hyperphosphorylation de la cofiline qui augmente en fonction de l'âge, dans le cortex des souris WT, dans le cortex des souris transgéniques APP/PS-1 et également dans des cultures primaires de neurones corticaux ou de fibroblastes d'embryons de souris (Barone et al., 2014). Ces résultats remettent en question l'idée que l'hyperactivité de la cofiline et la dépolymérisation de l'actine sont à l'origine de la synaptotoxicité et de l'effondrement synaptique

Si l'effondrement des épines et donc la disparition des synapses sont les meilleurs marqueurs des dysfonctions cognitives dans la MA, très peu d'études ont cherché à caractériser les anomalies morphologiques des épines qui pourraient précéder la disparition synaptique. Pourtant, ce type d'altération est retrouvé dans d'autres maladies neurologiques comme la schizophrénie, certaines formes d'autismes (Penzes et al., 2011) ou le syndrome FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein ; Irwin et al., 2000). Lacor et collaborateurs ont brièvement décrit les déformations des épines, induites par l'A β , comme des « protrusions anormales longues d'au moins 2 μ m » ou « épines allongées » (Lacor et al., 2007). Ces épines anormales apparaissent après 3 heures de traitement à l'A β à 500 nM. Mais cet aspect de la synaptotoxicité A β -dépendante mérite des études plus exhaustives.

De surprenants changements morphologiques s'opèrent dans les synapses en contexte physiologique, à travers la formation de spinules. Les spinules, comme nous l'avons vu au chapitre 2, sont considérées comme une manifestation de communication spino-axonale par évagination membranaire, qui survient notamment en contexte de plasticité synaptique, en réponse à une intense stimulation. Leur mécanisme de formation et de régulation est encore très mal compris mais fait appel à des réarrangements d'actine (De Juan & Garcia, 1998 ; Spacek and Harris, 2004). Malgré leur nature indicative d'activité synaptique intense, et malgré la découverte de distorsions dans la forme des épines par l'A β , l'impact du peptide sur la formation des spinules et/ou leur possible dérégulation n'a encore jamais été étudié. Il reste donc encore de nombreux mécanismes à découvrir quant à l'impact de l'A β sur la morphologie des épines.

3. La souris APP/PS-1

La souris APP/PS1-21 ou APP/PS-1 est un modèle de souris transgénique largement utilisé dans l'étude de la MA. Il existe plusieurs lignées de souris APP/PS-1, qui se différencient par exemple au niveau de leur site de mutation du gène PS-1. Les mutations de PS-1 sont majoritairement rassemblées au niveau de l'exon 9. La ou les mutations d'un ou de plusieurs sites d'intérêt, voire la délétion complète de l'exon 9 ont des effets similaires et augmentent la production d'A β (Steiner et al., 2001 ; Jankowsky et al., 2003 ; Berezovska et al., 2005). Mais la mutation PS1-L166P est connue pour être la forme familiale de la MA la plus agressive (Moehlmann et al., 2002). Les lignées APP/PS-1 se différencient également au niveau de la régulation de l'expression des transgènes. L'expression peut être contrôlée soit par l'utilisation du promoteur Thy1, soit régulée par les promoteurs endogènes (Radde et al., 2006 ; Murphy et al., 2007). Dans notre étude, la lignée APP/PS-1 utilisée est celle mise au point par Rebecca Radde et collaborateurs en 2006. La souris transgénique APP KM670/671NL + PS1-L166P est une lignée humanisée sur fond génétique de C57BL/6J, possédant ainsi la mutation Swedish de l'APP et la mutation L166P de la PS-1 (Radde et al., 2006), ce qui permet d'obtenir rapidement un phénotype pathologique dans le cerveau des souris APP/PS1. L'expression des formes mutées d'APP et de PS-1 est régie par l'activation du promoteur Thy1, ce qui permet une expression cérébrale des transgènes après la naissance. A partir de 2 mois, l'A β ₄₂ est produit en quantités abondantes et 5 fois plus que l'A β ₄₀. Les plaques amyloïdes commencent à apparaître dans le cortex vers 2 mois, puis dans l'hippocampe vers 3 mois (Radde et al., 2006).

Les neurones de la région CA1 de la souris APP/PS-1 sont hyperexcitables et présentent une arborescence dendritique moins développée (Šišková et al., 2014). Dans cette même région, la LTP est altérée à partir de 8 mois (Gengler et al., 2010). Dans l'hippocampe, la densité d'épines est diminuée au niveau du stratum lacunosum-moleculare (Šišková et al., 2014). Dans une étude de 2010, Couch et collaborateurs ont également montré dans la région CA1 une diminution de la longueur et des branchements dendritiques, imputable à une hyperactivité de RockII. Le phénotype peut être restauré par administration de fasudil chez l'animal, à raison de 0,6mg/kg/jour pendant 24-26 jours (Couch et al., 2010). Dans cette étude également, l'implication de l'hyperactivité de RockII sur la morphologie des épines n'a pas été étudiée.

Une autre étude morphologique a été réalisée chez la souris APP/PS-1 délétée de l'exon 9. La reconstruction 3D d'électronographies sériées montre dans le gyrus denté des souris transgéniques (12-14 mois) que la densité de synapses est réduite comparée à celle de souris WT, mais que les synapses restantes présentent un volume plus élevé (Alonso-Nanclares et al., 2013). Ce morphotype pourrait être associé à une inactivation de la cofiline dans le gyrus denté, vu chez la souris transgénique et chez l'humain (Barone et al., 2014).

Ainsi, la souris APP/PS-1 constitue un très bon modèle d'étude de la MA. En corrélation avec les travaux de Lacor et collaborateurs en 2007 travaillant sur neurones en

culture, une anomalie morphologique des épines est vue chez la souris APP/PS-1. Les mécanismes à l'origine de ces déformations sont encore mal compris et très peu étudiés. De même, l'impact du peptide A β sur la formation des spinules n'a encore jamais été abordé. Cette question laissée sans réponse constituera notre premier champ d'étude.

Objectifs

Au cours de ce travail de thèse, nous avons voulu mieux comprendre comment l'A β o impacte sur la morphologie des épines, par quel(s) mécanismes l'A β o perturbe le cytosquelette d'actine dans l'épine, et comment nous pourrions restaurer une activité physiologique, afin de renforcer et consolider les synapses des patients malades, et ainsi retarder les déficits cognitifs, notamment mnésiques.

Les spinules sont considérés comme des marqueurs de communication rétrograde spino-axonal, particulièrement visibles en conditions d'intense activation (Richards et al., 2005 ; Tao-Cheng et al., 2009). Le remodelage des spinules est actine-dépendant (De Juan & Garcia, 1998). Malgré le fait établi que l'A β o perturbe la morphologie des synapses, induit leur effondrement et altère l'activité de la cofiline (Shankar et al., 2007; Barone et al., 2014), aucune étude n'a été menée quant à une possible altération des spinules par l'A β o. La première partie de ce travail de thèse a été de réaliser une analyse multiparamétrique des épines dendritiques de la région CA1 chez la souris APP/PS1-21 en microscopie électronique et de caractériser les altérations du nombre et de la morphologie des spinules par la présence d'A β o.

Les résultats obtenus ont ensuite été reproduits sur un modèle *in vitro* de culture primaire de neurones corticaux traités à l'A β o de manière aigue. Les épines ont été classées en fonction de leur sous-type respectif, afin d'identifier un ou des sous-types d'épines davantage sujet(s) aux altérations A β o-dépendantes. Nous avons également examiné la dynamique du cytosquelette, et déterminé la proportion d'actine filamenteuse dans une épine individuelle, en conditions pathologiques. Les remodelages morphologiques de l'épine sont décrits comme associés à des modifications fonctionnelles (Fukazawa et al., 2003 ; Okamoto et al., 2004). Dans notre étude nous avons examiné si les altérations morphologiques des épines par l'A β o pouvaient être associées à une altération de l'activité de kinases impliquées dans les processus fonctionnels de la plasticité. Ceci va nous permettre de comprendre si les modifications morphologiques des épines sont dues à une activation synaptique A β o-dépendante.

Dans une deuxième partie, nous avons cherché à mieux caractériser la dérégulation de la cofiline par l'A β o (Shankar et al., 2007 ; Barone et al., 2014). Dans notre système d'étude, nous avons étudié le niveau de cofiline inactivée par phosphorylation de son résidu sérine3. Nous avons étudié par la suite l'implication de la voie cofiline-dépendante dans l'altération de la morphologie des épines induite par l'A β o, et notamment le rôle de la RockII. Enfin, nous avons cherché à voir si les altérations de la cofiline par l'A β o observées sur des modèles cellulaires pouvaient être retrouvées chez un modèle animal de la MA et chez les patients atteint de MA.

En résumé, ce travail de thèse a tenté d'apporter des éléments nouveaux sur les modifications morphologiques des synapses induites par la présence d'A β o. L'étude a été faite sur des animaux transgéniques modèles de la MA, puis sur modèle cellulaire, pour mieux

spécifier les effets morpho-toxiques de l'A β o sur un ou des types d'épines dendritiques en particulier. Nous avons étudié ensuite la signalisation cellulaire impliquée dans les effets observés, notamment la voie RockII. Ce travail de thèse présente donc plusieurs aspects novateurs de l'étude de la MA. Nous avons cherché à établir un lien entre la présence d'A β o et l'altération d'un ou plusieurs sous-types d'épines ainsi que l'implication de la cofiline et de la voie RockII/Limk1 dans ce phénomène,

Chapitre 5 : Résultats

Les résultats de ma thèse sont présentés dans le document joint, faisant actuellement l'objet d'un article soumis pour publication :

Amyloid- β oligomers trigger dendritic spine and spinule morphological alterations by Cofilin1 phosphorylation

Marc Dollmeyer, José Martinez-Hernandez, Sylvie Boisseau, Muriel Jacquier-Sarlin, Eve Borel, Marie-Lise Frandemiche, Travis Rush, Karin Pernet-Gallay and Alain Buisson

INSERM, U836, BP 170, and Université Joseph Fourier, Grenoble Institut des Neurosciences, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France

Key words: amyloid-beta oligomers; dendritic spines; actin; Cofilin1; spinule

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by progressive cognitive decline associated with synaptic loss and dysfunction. If soluble amyloid- β oligomers (A β o) seem to exert a pivotal role in synaptotoxicity, the mechanism underlying this process remains to be deciphered.

Using electron microscopy, we characterized spine morphology at an early stage of the disease in a transgenic mouse model of AD: APP/PS1-21. In the hippocampus neuropile, we observed an important reduction of spine density. Surprisingly, the remaining spines displayed an abnormal phenotype with an increased surface/PSD ratio and the presence of aberrant spinules, emerging from dendritic spines and engulfed by the axonal button. These morphological alterations suggest severe perturbations of the actin cytoskeleton that shape synapse morphology. Using cortical cultured neurons, we further studied the consequences of A β o exposure on synaptic morphology. We showed that A β o treatment promotes spine enlargement as well as formation of actin enriched membrane protrusion emerging from the spine's apex.

Using Lifeact-eGFP and FRAP experiments, we further characterized the dynamic properties of actin cytoskeleton. We demonstrated that A β o promotes an increased stability of synaptic actin cytoskeleton and phosphorylation of Cofilin1, an F-actin disassembly factor. Treatment with Fasudil, an inhibitor of the Lim-k1/Rock pathway that regulates Cofilin1 phosphorylation restores actin dynamics in spines exposed to A β o supporting the involvement of Cofilin1 in the aberrant stabilization of the actin cytoskeleton. In addition, we observed an increased Cofilin1 phosphorylation in APP/PS-1 transgenic mice as well as in AD patient tissues. These results suggest that A β o alters dendritic spine morphology by inhibiting Cofilin1 activity.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurological disorder that is characterized by memory loss and confusion. There is good evidence indicating that the accumulation of the β -amyloid protein ($A\beta$), a 4-kDa polypeptide derived from the proteolytic cleavage of the $A\beta$ precursor protein (APP), is a primary event in the pathogenesis of AD (Goedert and Spillantini, 2006). Another cardinal feature of AD is the presence of intraneuronal neurofibrillary tangles, composed of insoluble aggregates of hyperphosphorylated microtubule-associated protein tau. The soluble forms of $A\beta$ independent of their accumulation into plaques drive healthy neurons into the diseased state (Lambert et al., 1998; Gong et al., 2003). Indeed, it has been shown that in the presence of $A\beta$, the electrophysiological correlates of synaptic plasticity are altered: long-term potentiation (LTP) is inhibited (Walsh et al., 2002) and long-term depression is potentiated (Cheng et al., 2009). Concurrently, several aspects of synaptic functions affected by $A\beta$ have been proposed as the molecular mechanism leading to abnormal synaptic plasticity ranging from enhanced glutamate receptor endocytosis (Snyder et al., 2005; Zhao et al., 2010) altered mitochondrial function as well as calcium homeostasis (Ferreira et al., 2015) and/or excessive extrasynaptic neurotransmission (Kerven et al., 2012). However, the molecular mechanisms leading to $A\beta$ -induced synapse dysfunction and loss remains to be fully understood.

Dendritic spines are the main post-synaptic sites for connections between neurons. They are structurally heterogeneous, varying in volume and number (Harris et al., 1992; Sorra & Harris 2000). Ultrastructural studies demonstrated that the volume and size of dendritic spine heads, but not the necks, are intimately associated with the number of synaptic vesicles within the axon terminals suggesting a direct relationship between spine head size and synaptic strength (Harris & Stevens 1989). Indeed, glutamate receptors, scaffolding proteins as well as other components of dendritic spines are clustered in the post synaptic density (PSD), a membranous micro-domain which volume is closely correlated to the volume of the spine (Harris, 2008). This structural plasticity of the dendritic spines relies on the actin cytoskeleton organization and dynamics (Star et al., 2002). It has been shown that filamentous/globular actin (F/G actin) ratio switches upon induction of long-term potentiation towards an increase in F-actin content in dendritic spines (Okamoto et al., 2004) to sustain spine enlargement. In addition, dendritic spine structural plasticity is characterized by activity-dependent formation of a particular structure, the synaptic spinule, which is characterized by a double-membrane evagination from the spine's apex, pointing towards the

axon terminal (Sorra et al., 1998; Spacek & Harris, 2004; Tao-Cheng et al., 2009). Thus by studying spine morphology in diseases we may learn more about the functional disturbance involved in the early stage of the disease.

In the present study we investigated A β induced dendritic spine structural alterations observed in the APP K670M/ N671L + PS-1 L166P AD transgenic mouse model of AD at the early stage of the disease (Radde et al., 2006). We further characterized A β induced morphological synaptic changes by studying actin cytoskeleton organization and dynamics in dendritic spines of cultured neurons exposed to A β . Taken together, these findings highlight A β induced synaptotoxic mechanisms and provides new hypothesis to further explain the impact of A β on synaptic function.

Materials and Methods

Transgenic Animal model of AD:

APP/PS1-21 (line 21) mice were used. APP/PS1-21 mice coexpress human APP carrying the K670N/M671L “Swedish” double mutation and hPsl L166P with a 3-fold overexpression of human APP over endogenous mouse APP. Mice express the transgene under the control of a neuron-specific mthy-1 promoter element and generated on a C57bl6 background.

Immunohistochemistry

Mice were deeply anesthetized with 10 % chloral hydrate and perfused intra-cardially with 10 ml 0.9 % NaCl followed by 35 ml 4 % paraformaldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.3. Brains were rapidly removed, post-fixed overnight at 4°C in 4 % paraformaldehyde, immersed in 20 % sucrose in 0.1 M PBS, pH 7.5 overnight, frozen in cooled (-35°C) isopentane and stored at -30°C. Serial frontal sections (30 μ m thickness) were cut with a cryostat microtome (HM 500 M, Microm, Francheville, France). Sections were re-hydrated in TBS buffer (0.1 M Tris Base, 0.15 M NaCl) and incubated in filtered 1 % aqueous Thioflavin-S (Sigma, France) for 8 minutes at room temperature, in the dark. After several washes in TBS buffer, sections were blocked by incubation with 3 % bovine serum albumin in TBS-Tween-Triton (TBSTT) (0.1 M Tris Base, 0.15 M NaCl, 0.1 % Tween, 0.1 % Triton X-100) for 30 minutes (dilution/blocking buffer). Tissue sections were then incubated overnight at 4 °C with an anti-NeuN antibody (AbCys, France, mouse monoclonal, 1:500). Tissue sections were washed in TBSTT and incubated for 2 h at room temperature with an Alexa Fluor cyanin 3-conjugated (Jackson ImmunoResearch Laboratories) secondary antibody (1:1000). Sections were washed

in TBSTT and mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories). Sections were examined with a Zeiss LSM 710 confocal laser scanning microscope with a Plan Apochromat 20x objective (NA 0.8) and translating platform with motorized crossed roller stages. Mosaics were acquired for each channel separately with “Zen” software, in a 12-bit format using the till scan function (2 or 20 fields of 708.49 μm x 708.49 μm for cortex or hippocampus respectively). Illustration images were merged with ImageJ software.

Electron microscopy

3 animals per genotype were randomly chosen between males and females at 3-months-old. Mice were sacrificed and hippocampi were immediately kept in ice-cold fixative (0.1 M Cacodylate, 2 % Glutaraldehyde, 2 % Paraformaldehyde, pH 7.2). After CA1 isolation, tissues were post-fixed with ice-cold osmium tetroxide 1% in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) for 1 h in the dark, and stained overnight at 4°C with uranyl acetate 0.5 % in water. Samples were then dehydrated in 30 % Ethanol bath, then 60 %, 90 % and 100 % for 10 min each. After impregnation, samples were embedded in Epoxy resin for 2 days at 60°C.

Ultrathin sections were cut with an ultramicrotome (Reichert Ultracuts S, Leica). At least for 4 sections (50 nm thickness) per animal were spread on carbonated grids. Grids were then stained in 5 % uranyl acetate in water, pH 4, in the dark for 10 min, washed and stained in lead citrate (4 mg/mL water) for 5 min. Ultrathin sections were observed under a transmission electron microscope (JEOL 1200 EX) and images were acquired with a digital camera (Veleta SIS). Images were analyzed with the iTEM (Olympus) software. For spine density analysis, whole fields were acquired at 30.000 to 40.000 magnification. For spine surface analysis, individual spines were imaged at 50.000 to 70.000 magnification. Synapses were chosen as asymmetric contact zones, displaying a defined synaptic cleft and two distinct plasma membranes, electron dense microdomains referred as the active zone (axon terminal) and the post-synaptic density (dendritic spine head) and vesicles in the presynaptic terminal. Spinules were defined as post-synaptic membrane evaginations pointing toward the axonal bouton or already engulfed. Spinules appear as constituted of a double plasma membrane and are devoid of electron-dense PSD components. Fields near cell bodies were avoided. An average of 180-200 synapses per animal for spine/spinule morphology and 12 whole fields for spine density were analyzed.

Primary cultures of cortical neurons

Mouse cortical neurons were cultured from 14- to 15-d-old OF1 embryos as described previously (Léveillé et al., 2008). Cerebral cortices were dissected, dissociated, and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 5 % fetal bovine serum, 5 % horse serum, and 2 mM Glutamine (all from Sigma) on 24-well plates (Falcon; Becton Dickinson) for biochemical experiments. Neurons were seeded on 35 mm glass-bottom dishes (MatTek, New York, USA) for confocal experiments. All plates and dishes were coated with 0.1 mg/mL poly-D-lysine and 0.02 mg/mL laminin (Sigma). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂/95 % air. After 3–4 d in vitro (DIV), cytosine arabinoside (AraC, 10 µM; Sigma) was added to inhibit proliferation of non-neuronal cells in cultures used for biochemistry experiments; 98 % of the cells were considered as neuronal. The day before the experiments, cells were washed in DMEM. Treatments were performed on neuronal cultures at 14–15 DIV.

Site directed mutagenesis

Constitutively phosphorylated (S3E) and dephosphorylated (S3A) Cofilin1-mCherry constructs were generated using “quick change” site directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, France), according to the manufacturer's instructions. The plasmids were sequenced to verify the mutagenesis before use.

Neuronal transfection

Transfections were performed on cortical neuron cultures after 12–13 DIV with calcium phosphate precipitation technique. Growth medium (DMEM and sera) was removed and kept until the last transfection step. Cells were washed for 1–1.5 h in DMKY buffer containing the following (in mM): 1 kynurenic acid, 0.9 NaOH, 0.5 HEPES, 10 MgCl₂, plus phenol red 0.05 %, pH 7.4. 3 µg of the following plasmids: PSD-95-GFP, Lifeact-RFP, Lifeact-eGFP, Actin-GFP, Cofilin1-S3E-mCherry and Cofilin1-S3A-mCherry were mixed with CaCl₂ (120 mM) in HBS containing the following (in mM): 25 HEPES, 140 NaCl, and 0.750 Na₂HPO₄, pH 7.06, and left for 15 min for DNA precipitation. Plasmids were applied 30 min. Transfection medium was replaced with conditioned growth medium and cultures were returned to the incubator until use at DIV 14–15.

Fluorescence recovery after photobleaching experiments

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) was performed on cultured neurons 48 h after transfection. Images were acquired with an inverted Nikon Eclipse Ti C2 confocal microscope with a Nikon 60X water objective with a 1.33 numerical aperture. Actin-GFP was bleached at 405 nm and the fluorescence recovery was measured for 120 s (at 1 s/frame). Fluorescent signal analysis was performed with the Nikon software Nis. Fluorescent signals were normalized relative to unbleached proximal dendrite and then pre-bleach values.

Dendritic spine imaging and analysis

Dendritic spine density and morphological analysis was performed on cultured neurons 24 h after lifeact-eGFP transfection. Transfected neurons were placed in HBBSS solution containing the following (in mM): 0.110 NaCl, 0.005 KCl, 2 CaCl₂, 0.0008 MgSO₄, 1 NaH₂PO₄, 12 HEPES, 5 D-glucose, 25 NaHCO₃, and 0.01 glycine (all from Sigma) 1.5–2 h before experiments. Images were acquired with an inverted Nikon Eclipse Ti C2 confocal microscope with a Nikon 60X water objective with a 1.33 numerical aperture. 20–25 μ m length dendritic section stacks were acquired at 512X512 resolutions. An average of 23 images per stack were acquired, with a z-step of 0.3 μ m. The same dendrite sections and spines were imaged before and 30 min after A β treatment. Images were then deconvoluted (AutoQuantX3) and fluorescent signal analysis was performed with the Nikon software NIS. Dendritic spines were quantified as F-actin enriched protrusions. Dendritic spine density analysis was performed using z-stack of 10 μ m length dendrite sections. For spine morphology analysis, each spine has been individually cropped for 3D visualization. Spine head and neck diameter have been measured in the xy and xz axis and averaged. Spines were classified as stubby (no distinguishable neck), filopodia (no defined head), thin (distinct head and neck, with a $\varnothing_{\text{head}} < 0.6 \mu\text{m}$ and a $\varnothing_{\text{head}}/\varnothing_{\text{neck}}$ ratio < 2), mushroom (distinct bulbous head and neck, with a $\varnothing_{\text{head}} > 0.6 \mu\text{m}$ and a $\varnothing_{\text{head}}/\varnothing_{\text{neck}}$ ratio > 2), branched (two heads sharing a common neck) and dimorphic (distinct head and neck, and presence of F-actin enriched protrusions $> 0.2 \mu\text{m}$ at head's top).

Subcellular fractionation

Primary cortical cultured neurons, mice cortices or human forebrain tissue (obtained from the Banco de Tejidos CIEN, Murcia, Spain) were homogenized in cold buffer containing 0.32 M sucrose and 10 mM HEPES, pH 7.4. Samples were maintained at 4°C during all steps of the

experiment. Homogenates were cleared at 1000 x g for 10 min to remove nuclei and large debris. The supernatants were centrifuged at 12,000 x g for 20 min to obtain a crude membrane fraction, which was then re-suspended twice (4 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4, 20 min at 12,000 x g). Then, the pellet was incubated (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 7.2) for 1 h at 4°C with mild agitation and centrifuged at 12,000 x g for 20 min (cultured neurons) to pellet the synaptosomal membrane fraction. The supernatant was collected as the non-postsynaptic density membrane fraction (non-PSD) or Triton-soluble fraction. The pellet was then solubilized (20 mM HEPES, 0.15 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % deoxycholic acid, 1 % SDS, pH 7.5) for 1 h at 4°C and centrifuged at 10,000 x g for 15 min. The supernatant contained the PSD or Triton-insoluble fraction. The integrity of non-PSD was verified by immunoblotting for synaptophysin, which was enriched in the non-PSD fraction, and the PSD fraction was confirmed by the immunoblotting of PSD-95 enriched in this compartment.

A β oligomerization

Recombinant A β 1–42 peptide (Bachem, Maneim, Germany) was resuspended in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol to 1 mM until complete resuspension as described previously (Stine et al., 2003). A β ’s were prepared by diluting A β to 1 mM in DMSO and then to 100 μ M in ice-cold HEPES and bicarbonate-buffered saline solution (HBBSS) with immediate vortexing and bath sonication, and then incubated at 4°C for 24 h under mild agitation.

Immunoblotting

Samples in loading buffer were boiled for 5 min (10 min for tissue samples) and equal amounts of proteins (10–25 μ g, quantified by micro-BCA assay (Pierce) in duplicate for cell extracts, in triplicate for tissues) were resolved on a 4–20 % gradient Bis-Tris polyacrylamide precast gels (Bio-Rad) + stain-free system for tissues (Bio-Rad) in denaturing conditions. Proteins were transferred to a poly vinylidenedifluoride membrane (Millipore) for 35 min at 4°C. Membranes were blocked with Tris-buffered saline (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) containing 0.02 % Tween 20 and 3 % BSA for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies:

| Antibody | Specie | Dilution | Supplier |
|-----------------------------|---------------------|-----------------|------------------------|
| Anti-beta amyloid 17-24 4G8 | Mouse (monoclonal) | 1/5000 | Covance (SIG-39220) |
| PSD-95 | Mouse (monoclonal) | 1/1000 | Abcam (ab2723) |
| Synaptophysin | Mouse (monoclonal) | 1/1000 | Abcam (ab8049) |
| P-Erk ½ (Thr202/Tyr204) | Rabbit (polyclonal) | 1/500 | Santa-Cruz (sc-16982) |
| Erk ½ | Mouse (monoclonal) | 1/500 | Santa-Cruz (sc-135900) |
| P-Cofilin1 (Ser3) | Rabbit (polyclonal) | 1/300 | Santa-Cruz (sc-21867) |
| Cofilin1 | Rabbit (polyclonal) | 1/500 | Santa-Cruz (sc-33779) |

Membranes were incubated with the HRP-conjugated secondary antibodies rabbit (1:40,000) and mouse (1:5000) (both from Sigma) for 45 min at room temperature. Specific proteins were visualized with an enhanced chemiluminescence ECL Detection System (Bio-Rad). Chemiluminescence detections were performed under dark atmosphere with hyperfilms (GE Healthcare) and analyzed with ImageJ software. For tissue analysis, chemiluminescence signals were normalized to protein loading signals acquired using Stain-free pre-cast gels (Bio-Rad) illumination by the chemidoc system (Bio-Rad) and analyzed with ImageLab (Bio-Rad).

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm S.E.M from independent biological samples. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.0.

Results

Abnormal spine and spinule morphology in 3-month-old APP/PS-1 hippocampus

To investigate the influence of soluble A β on synapse morphology, we performed our experiments in APP/PS-1 mice, an animal model of AD that contains human transgenes for both APP bearing the Swedish mutation and PSEN1 containing an L166P mutation, both under the control of the Thy1 promoter. These mice exhibit an expression of the human APP transgene approximately 3-fold higher than endogenous murine APP and preferentially produced Human A β 42 over A β 40 (Radde et al., 2006; Maia et al., 2013). As previously described by Radde et al. (2006), the presence of amyloid plaques were detected in cortices of 3-month-old animals and in the hippocampi after 6 months in transgenic mice. (Fig 1.A.). Thus, we chose 3-month-old Tg hippocampal CA1, a brain region devoid of amyloid plaques for electron microscopy analysis. We observed a reduction of synapse density in APP/PS-1 mice when compared to wild type littermate. Spine density was 0.298 ± 0.016 and $0.223 \pm$

0.015 synapses/ μm^2 in WT and Tg mice respectively, showing a 24.14 % reduction (** $p < 0.001$, 2-tailed student t-test, fig. 1.B). The spine head surfaces were larger in APP/PS-1 mice ($2.591 \pm 0.092 \mu\text{m}^2$) when compared to the control synapses ($1.513 \pm 0.051 \mu\text{m}^2$, fig. 2.A) (** $p < 0.001$, 2-tailed student t-test). The post synaptic densities were thicker in Tg mice ($47.91 \pm 0.730 \text{ nm}$) when compared to the control ($41.61 \pm 0.533 \text{ nm}$) (** $p < 0.001$, 2-tailed student t-test, fig. 2.C). The spine length was not different in WT and APP/PS-1 mice (Fig. 2.B; WT 327.9 ± 4.790 vs $332.0 \pm 5.567 \text{ nm}$). The ratio between PSD length and spine head surface was reduced by 20.50 % in Tg mice if compared to WT littermates (** $p < 0.001$, 2-tailed student t-test; WT 11.41 ± 0.253 vs Tg $9.072 \pm 0.269 \%$; Fig. 2.D).

In WT animals, spinules were frequently observed in the axonal button ($34.22 \pm 2.919 \%$ of synapses). These structures were identified as double membrane inclusions that are issued from the protrusion of the post-synaptic membrane in the presynaptic compartment. In Tg animals the number of spinules was reduced to $18.10 \pm 3.262 \%$. (** $p < 0.01$, 2-tailed student t-test) (Fig 3.A). In addition, spinule diameter was significantly larger in Tg mice (** $p < 0.001$, 2-tailed student t-test; WT 115.4 ± 1.708 vs Tg $166.5 \pm 4.056 \text{ nm}$, Fig 3.B) when compared to the control. Together, these results suggest that in the CA1 area of APP/PS-1, dendritic spines display structural alterations characterized by disrupted PSD/spine surface ratio and altered spinule morphology.

A β o triggers dendritic spine morphological alterations and increases F-actin content

Actin meshwork is specifically enriched in the post-synaptic compartment and has a preponderant impact on synaptic morphology (Star et al., 2002). In a next step we wanted to determine the contribution of actin cytoskeleton in the morphological alterations observed in Tg animals at an early stage of AD. For this purpose, we monitored the effect of A β o exposure on F-actin organization in spines of primary cortical cultured neurons transfected with a cDNA encoding for Lifeact-RFP/eGFP, a small 17 aa peptide that specifically binds to F-actin (Riedl et al., 2008) without inducing any actin overexpression or perturbation in the stoichiometry of endogenous actin binding proteins. When we co-transfected cDNA encoding for PSD-95-GFP and Lifeact-RFP we observed a colocalization of the resulting fluorescence in the dendritic spine validating the role of actin meshwork in the spine morphology (Fig 4.A). Lifeact-RFP labeling was then systematically used to monitor the morphology of the post-synaptic compartment. Cultured neurons were transfected with Lifeact-eGFP alone and neurons were exposed to acute Human A β o at 100 nM for 30 min, a time lapse sufficient to

impair LTP in acute slices (Walsh et al., 2002). The same dendritic sections and spines were imaged before and after A β o exposure (Fig 4.B) and every protrusion (>0.2 μ m in length) emerging from the dendritic shaft and enriched in F-actin were considered as dendritic spines. We observed that A β o exposure significantly increases spine surface (***p<0.001, 2-tailed paired student t-test; before A β o 0.5753 ± 0.042 vs after A β o $1.181 \pm 0.1562 \mu\text{m}^2$; fig 4.D) and concomitantly induces a 1.3-fold increase in Lifeact-eGFP related fluorescence (***p<0.001, 2-tailed Paired student t-test; Fig 4.E).

Strikingly, some spines displayed F-actin enriched protrusions pointing from the spine's apex (Fig 4.B). To highlight which type of spine is subjected to such morphological alterations, we next performed spine sub-type density analysis in the presence of A β o at 100 nM for 30 min. When we classified dendritic spines in 6 different classes such as immature filopodia-like protrusions and stubby spines, thin spines, bi-headed branched spines, mature or mushroom spines and A β o-induced dismorphic spines (Fig 4.F, see also materials and methods), we found that mushroom-type spine density was selectively decreased in the presence of A β o (***p<0.001, repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test; before A β o 2.440 ± 0.259 vs after A β o 0.960 ± 0.178 mushroom spines per 10 μ m of dendrite; Fig 4.G) whereas dismorphic spine population was dramatically increased (***p<0.001, repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test; before A β o 0.240 ± 0.119 vs after A β o 2.640 ± 0.288 dismorphic spines per 10 μ m of dendrite; Fig 4.G).

These data show that acute A β o treatment induces an increase in F-actin content in mushroom spines and consequently promotes dismorphic spines characterized by F-actin enriched protrusions.

A β o induced mushroom spine alterations are not associated with synaptic activity, but involve the actin disassembly protein Cofilin1

In physiological conditions dendritic spine head enlargement and spinule formation are both associated with synaptic plasticity and specific signaling pathway activation (Okamoto et al., 2004; Tao-Cheng et al., 2009) such as Erk^{1/2} kinase (Patterson et al., 2010; El gaamouch et al., 2012). To test whether A β o-induced dendritic spine morphological alterations are due to synaptic activity, we performed western blotting of phosphorylated forms of Erk^{1/2} on PSD-enriched fraction (Fig 5.A). We did not find any significant variation in the recruitment of

Erk^{1/2} to the spine or modification of the phosphorylation state of Erk (Fig 5.B & C) suggesting the absence of neuronal activation in the morphological modifications observed.

Spine enlargement is usually associated with increased actin polymerization (Okamoto et al., 2004). This feature may rely on the inactivation of the F-actin disassembly factor Cofilin1 enzyme by its phosphorylation on the Serine 3 residue (Chen et al., 2007). By performing immunoblotting of the PSD enriched fraction, we observed that A β o exposure induced the recruitment of Cofilin1 to the spine (**p < 0.001, 2-tailed Mann Whitney t-test; CT 165.6 \pm 16.35 vs A β o 30 min 293.6 \pm 11.38 A.U, N \geq 7 independent cultures; Fig. 5.D) and triggered phosphorylation of Cofilin1 (**p < 0.001, 2-tailed Mann Whitney t-test; CT 116.6 \pm 15.86 vs A β o 30 min 378.0 \pm 34.02 A.U, N \geq 7 independent cultures). To monitor the consequence of Cofilin1 phosphorylation on F-actin dynamics within dendritic spines, we performed fluorescence recovery after photobleaching experiments (FRAP) on actin-GFP transfected cultured neurons. In control conditions actin-GFP fluorescence intensity recovered about 75 % of its initial fluorescence level (75.00 \pm 2.721 %; Fig 5.F) 2 min after photobleaching. After A β o exposure (100 nM for 30 min), actin-GFP fluorescence only recovered 55 % of its fluorescence intensity (54.67 \pm 2.374 %; Fig 5.F). A β o exposure promotes a decrease in actin-GFP recovery by 27 % (**p<0.001, paired 2-tailed student t-test; Before A β o 100.0 \pm 3.582 vs A β o 30 min 72.96 \pm 3.177 %; Fig 5.G).

Taken together, these results demonstrated that A β o triggers the recruitment and the phosphorylation of Cofilin1 in the dendritic spine and consequently induces stabilization of the actin meshwork.

Actin dynamics are not affected by A β o in the presence of both phospho-active or inactive Cofilin1 mutants

To assess the role of A β o-mediated Cofilin1 inactivation on actin dynamics, neurons were co-transfected with GFP-labeled actin and either constitutively active or inactive Cofilin1-mCherry. Dephosphorylated/active Cofilin1 was designed by replacing the Serine 3 residue by Alanine (Cofilin1-S3A) whereas the same residue was replaced by glutamate for the phosphorylated/inactive Cofilin1 (Cofilin1-S3E). After transfection with actin-GFP and Cofilin1-S3E-mCherry (inactive Cofilin1) neurons displayed morphological alterations of dendritic spines characterized by actin-GFP labeled protrusions emerging from the spine head (Fig 6.A). As expected, transfected neurons in FRAP experiments revealed that actin was stabilized and recovered to an average of 60.39 \pm 2.713 % (light-grey curve; Fig 6.B) of the

pre-bleached fluorescence values. In these neurons, A β o exposure (100 nM for 30 min) did not alter actin-GFP recovery values (59.90 ± 2.864 %) (dark-grey curve; Fig 6.B). In summary, in neurons expressing inactive Cofilin1-S3E, actin-GFP recovery values were significantly 20 % lower than control and unaffected by A β o exposure (*** $p < 0.001$, one-way ANOVA followed by Bonferroni test; CT 100.0 ± 3.085 vs Cofilin1-S3E before A β o 80.61 ± 3.498 vs after A β o 80.88 ± 3.797 %; mean \pm S.E.M, N= 52 spines from ≥ 5 different neurons from ≥ 4 independent cultures; Fig 6.B, mid-grey curve and Fig 6.C). These results show that inactive Cofilin1 is sufficient to reduce actin dynamics in spines by 20 % and that in such conditions, A β o exposure shows no cumulative effect.

FRAP experiments were also performed on neurons co-transfected with Actin-GFP and Cofilin1-S3A-mCherry (constitutively active Cofilin1). In these conditions, we noticed the presence of many small immature stubby spines and filopodia-like protrusions. Spines had smaller heads and shorter necks. FRAP experiments did not reveal any differences in actin dynamics induced by A β o exposure (CT 75.00 ± 2.721 , mid-grey curve, vs before A β o 74.53 ± 3.594 , light-grey curves vs A β o 30 min 68.40 ± 2.583 %, dark-grey curve, Mean \pm S.E.M, N ≥ 52 spines over ≥ 5 different neurons from ≥ 5 independent cultures, Fig 7.B and 7.C). These data strengthened the previous observations that A β o-induced Cofilin1 phosphorylation is a key step in A β o-mediated actin stabilization within dendritic spines.

RockII inhibition by Fasudil application restores actin dynamics in spines after A β o treatment

In spines, Cofilin1 phosphorylation is mediated by Lim-k1, which is itself activated by RockII kinase (Edwards et al., 1999; Mizuno, 2013). To address whether Cofilin1 phosphorylation by A β o is dependent of the Lim-k1/RockII pathway, immunoblots were performed on PSD fractions from cultured neurons exposed to either A β o (100 nM) or the RockII inhibitor Fasudil alone (100 μ M) or A β o followed by Fasudil. If Fasudil treatment alone did not alter basal Cofilin1 phosphorylation and recruitment to the PSD fraction (Fig 8.A, B & C). Fasudil treatment reduced A β o-induced phosphorylated Cofilin1 to baseline levels (* different from A β o * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Ct 20.22 ± 0.920 vs Fasudil 22.24 ± 1.123 vs A β o 33.43 ± 0.726 vs A β o + Fasudil 24.10 ± 1.175 A.U, Mean \pm S.E.M, statistical analysis, one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test, N= 4 independent cultures, Fig. 8.B). FRAP experiments were performed in actin-GFP transfected neurons, treated with either A β o (100 nM for 30 min), Fasudil alone (100 μ M for 15 min) or A β o followed by Fasudil (15+15 min).

Fasudil alone did not modify actin-GFP recovery (Ct 75.00 ± 2.721 vs Fasudil 76.07 ± 2.995 %; Mean \pm S.E.M) whereas A β o-induced actin-GFP recovery signal stabilization was reversed to baseline by Fasudil treatment (A β o 54.67 ± 2.374 vs A β o+ Fas 71.34 ± 2.582 %, Mean \pm S.E.M). These results reveal that actin stabilization induced by A β o in spines by Cofilin1 phosphorylation involves RockII signaling pathway and that inactivation of this signaling pathway by Fasudil treatment reverses A β o induced alterations of actin dynamics.

A β o induced cofilin1 phosphorylation *in vitro* is also present in 3-month-old APP/PS-1 mice and prefrontal cortices of AD patients.

Finally, we investigated whether abnormal Cofilin1 phosphorylation observed in cellular models of AD could also be detected in animal models of the disease and in AD patients' brains tissue. We performed tissue fractionation from 3-month-old WT and APP/PS-1-21 mice cortical tissue and from pre-frontal cortex of AD brains. We found that Tg mice displayed higher levels of phosphorylated Cofilin1 than WT littermates (WT 0.6682 ± 0.070 vs APP/PS-1 1.240 ± 0.119 A.U, Mean \pm S.E.M, ** $p < 0.01$, statistical analysis, unpaired 2-tailed Mann-Whitney t-test, Fig 9. B, N= 11 WT and 9 APP/PS-1 mice cortices) while total Cofilin1 levels were similar (Fig 9. C). In AD patients' tissue total Cofilin1 remained unchanged in the PSD fraction (Fig 9.E) but phosphorylated Cofilin1 was increased in AD (Control 0.443 ± 0.188 vs Alzheimer's 1.328 ± 0.174 A.U, Mean \pm S.E.M, * $p < 0.05$, statistical analysis, unpaired 2-tailed Mann-Whitney t-test, Fig 9. D, N= 3 control and 5 AD pre-frontal cortices.). These results confirm that Cofilin1 phosphorylation is a common feature of cultured neurons exposed to A β o as well as in APP/PS-1 mice and AD patients' brains.

Discussion

A β o is now considered as a pivotal player in the physiopathology of AD. It has been implicated in synaptic plasticity impairment (Walsh et al., 2002; Shankar, et al., 2008) and in the progressive loss of synapse observed in AD patients' brains (Gong et al., 2003) as well as in cultured hippocampal slices and neurons (Lacor et al., 2007; Shankar et al., 2007). However, the mechanisms underlying these defects are still poorly understood. In this study, we monitored synaptic morphology modifications observed in APP/PS-1-21, an animal model of AD, at an early stage of the disease, in cortical neurons exposed to synthetic Human A β o. We showed that in early stages of the disease APP/PS1-21 mice display a decrease in synapse

density in CA1 area of the hippocampus associated with an increase in the size of remaining dendritic spines confirming previous observations in hippocampus dentate gyrus of another model of AD (Alonso-Nanclares et al., 2013). The normal thickness of the PSD in Tg animals suggests that the remaining synapses are still functional (Dosemeci et al., 2001). However altered PSD length/spine head surface ratio reflects a major dysregulation of dendritic spine morphological structure. Another morphological modification observed is the presence of spinules, inclusions with a double membrane in the axonal button that could be observed by transmission electron microscopy. These structures arise from the plasma membrane of the spine and protrude into the presynaptic axonal button. These structures have been described as a functional and structural index of synaptic plasticity (Spacek & Harris, 2004, Sorra et al., 1998; Tao-Cheng et al., 2009). Here we showed that Tg mice display a reduction of spinule-positive synapses than wild-type littermates and an abnormal spinule size. Hence, we revealed that in Tg animal model of AD, remaining synapses at an early stage of the disease display altered morphology characterized by larger spines and spinules.

In physiological conditions, dendritic spine structural modifications as well as spinule formation are both driven by synaptic activity and rely on actin remodeling (De Juan & Garcia, 1998; Okamoto et al., 2004). In cellular models of AD, it has been shown that A β triggers the formation of abnormal dendritic spines referred as elongated spines by Lacor et al. (2007). Here we monitor A β -driven dendritic spine shape alterations and F-actin remodeling in the presence of synthetic Human A β . We showed that if A β treatment did not change spine density, it increased the surface and the F-actin content of dendritic spines. Indeed some mushroom-type spines displayed abnormal F-actin enriched protrusions at their apex. These results suggest that A β promotes organization of synaptic actin cytoskeleton.

This increase in dendritic spine size was not correlated with enhanced synaptic activity. Indeed we showed that phosphorylation of Erk^{1/2}, kinases involved in both early and late phases of LTP (Davis et al., 2000; Patterson et al., 2010) did not display any modification in the total amount of Erk^{1/2} or in their phosphorylation state.

To determine how A β triggers synaptic actin cytoskeleton disorganization, we studied the localization and the phosphorylation of Cofilin1, an actin binding protein that underlies activity-dependent spine head enlargement during LTP (Chen et al., 2007). In AD, several studies have suggested that synaptotoxicity relies on hyper or hypoactivity of Cofilin1 (Shankar et al., 2007; Barone et al., 2014). Here we showed an increase in phosphorylation of

Cofilin1 in AD patients' frontal cortices, in APP/PS-1-21 cortices and in primary cortical neurons exposed to Human A β o. This abnormal Cofilin1 inactivation may result in F-actin stabilization in the spine head. FRAP experiments performed with actin-GFP on cultured neurons comforted this hypothesis. To study the effects of Cofilin1 phosphorylation on actin dynamics we demonstrated that phospho-active (S3A) Cofilin1 expression promotes actin dynamic whereas phospho-inactive Cofilin1 (S3E) potentiates actin stabilization. When expressed in neurons, both of these constructs abolished A β o mediated actin stabilization. These results support the idea that A β o-induced dendritic spines aberrant actin cytoskeleton organization is mediated by Cofilin1 inactivation. The fact that both A β o-induced Cofilin1 phosphorylation and actin stabilization can be restored by exposing neurons to the RockII inhibitor Fasudil further strengthens this hypothesis and supports a putative involvement of the GTPase regulatory pathway/network.

To conclude, our study shows that synaptotoxicity is not only characterized by a reduced spine density but also by morphological aberrations of remaining synapses including unproportioned PSD and spine head size evolution and abnormal spinule formation and structure. These morphological abnormalities are present in primary cortical neurons exposed to synthetic A β o and are correlated with Cofilin1 phosphorylation, leading to aberrant synaptic actin polymerization. The fact that A β o-induced actin stabilization and Cofilin1 phosphorylation can be restored by Fasudil application involves the RhoA/RockII/Limk1/Cofilin1 pathways and might offer a new therapeutic approach to treat early cognitive deficits encountered in the disease.

References

- Alonso-Nanclares L, Merino-Serrais P, Gonzales S, DeFelipe J, (2013) Synaptic changes in the dentate gyrus of APP/PS1 transgenic mice revealed by electron microscopy. *J Neuropathol Exp Neurol* 72(5), pp.386–395.
- Barone E, Mosser S, Fraering PC (2014) Inactivation of brain Cofilin-1 by age Alzheimer's disease and γ -sécrétase. *Biochim Biophys Acta* 1842, 2500-2509.
- Bernstein BW, Bamburg JR (2010) ADF/Cofilin: A functional node in cell biology. *Trends Cell Biol* 20(4), pp.187–195.
- Chen LY, Rex CS, Casale MS, Gall CM, Lynch G (2007) Changes in Synaptic Morphology accompany Actin Signaling during LTP. *J Neurosci* 27(20), pp.5363–5372.

Cheng L, Yin WJ, Zhang JF, Qi JS (2009) Amyloid β -protein fragments 25-35 and 31-35 potentiate long-term depression in hippocampal CA1 region of rats in vivo. *Synapse* 63(3), pp.206–214.

Davis S, Vanhoutte P, Pages C, Caboche J, Laroche S. (2000) The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 20(12): 4563-4572.

De Juan J, Garcia M., 1998. Interocular effect of actin depolymerization on spinule formation in teleost retina. *Brain Res* Volume 792, Issue 1, 4 May, Pages 173–177.

Dosemeci A, Tao-Cheng JH, Vinade L, Winters CA, Pozzo-Miller L, Reese TS (2001) Glutamate-induced transient modification of the postsynaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 28;98(18):10428-32.

Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* 1(5), pp.253–259.

El Gaamouch F, Buisson A, Moustié O, Lemieux M, Labrecque S, Bontempi B, De Koninck P, Nicole O (2012). Interaction Between CaMKII and GluN2B Controls ERK-Dependent Plasticity. *J Neurosci* 32(31), pp.10767–10779.

Ferreira IL, Ferreira E, Schmidt J, Cardoso JM, Pereira CM, Carvalho AL, Oliveira CR, Rego AC (2015) A β and NMDAR activation cause mitochondrial dysfunction involving ER calcium release. *Neurobiol Aging* 36(2), pp.680–92.

Fransdemiche ML, De Seranno S, Rush T, Borel E, Elie A, Arnal I, Lanté F, Buisson A (2014) Activity-Dependent Tau Protein Translocation to excitatory synapses is disrupted by Exposure to Amyloid-Beta Oligomers. *J Neurosci* 34 (17): 6084-6097.

Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (2003) Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(18), pp.10417–10422.

Goedert M, Spillantini MG (2006) A century of Alzheimer's disease. *Science* Nov 3;314(5800):777-81.

Harris K M (2008) Diversity in Synapse structure and composition. Chapter Structural And Functional Organization Of The Synapse pp 1-22 Springer Science+Business Media.

Harris KM, Jensen FE, Tsao B (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the

maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci* 12(7), pp.2685–2705.

Harris KM, Stevens JK (1989) Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics *J Neurosci* Aug;9(8):2982-97.

Herskowitz JH, Feng Y, Mattheyses AL, Hales CM, Higginbotham LA, Duong DM, Montine TJ, Troncoso JC, Thambisetty M, Seyfried NT, Levey AI, Lah JJ (2013) Pharmacologic Inhibition of ROCK2 Suppresses Amyloid- β Production in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *J Neurosci* 33(49), pp.19086–19098.

Kervern M, Angeli A, Nicole O, Léveillé F, Parent B, Villette V, Buisson A, Dutar P (2012) Selective impairment of some forms of synaptic plasticity by Oligomeric Amyloid- β peptide in the mouse hippocampus: Implications of Extrasynaptic NMDA receptors. *J Alzheimers Disease*. 32: 183-196.

Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL (2007) A β Oligomer-Induced Aberrations in Synapse Composition, Shape, and Density Provide a Molecular Basis for Loss of Connectivity in Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 27(4), pp.796–807.

Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11), pp.6448–6453.

Léveillé F, El Gaamouch F, Goux E, Lecocq M, Lobner D, Nicole O, Buisson A (2008) Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J* 22:4258-4271.

Maia LF, Kaeser SA, Reichwald J, Hruscha M, Martus P, Staufenbiel M, Jucker M (2013) Changes in amyloid- β and Tau in the cerebrospinal fluid of transgenic mice overexpressing amyloid precursor protein. *Sci Transl Med*. Jul 17;5(194):194re2

Mizuno K (2013) Signaling mechanisms and functional roles of Cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cellular Signal*, 25(2), pp.457–469.

Ohashi K, Nagata K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S, Mizuno K (2000) Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J Biol Chem*, 275(5), pp.3577–82.

Okamoto K, Nagai T, Miyawaki A, Hayashi Y (2004) Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat neurosci* 7(10), pp.1104–1112.

Patterson M, Szatmari EM, Yasuda R (2010). AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(36), pp.15951–15956.

Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, Calhoun ME, Jäggi F, Wolburg H, Gengler S, Haass C, Ghetti B, Czech C, Hölscher C, Mathews PM, Jucker M (2006) Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO reports* 7 (9). pp 940-946.

Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Werb Z, Sixt M, Wedlich-Soldner R (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5(7), pp.605–7.

Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL (2007) Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. *J Neurosci* 27(11), pp.2866–2875.

Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14(8), pp.837–842.

Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8(8), pp.1051–1058.

Sorra, KE, Harris KM (2000) Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 10(5), pp.501–511.

Sorra KE, Fiala JC, Harris KM (1998) Critical assessment of the involvement of perforations, spinules, and spine branching in hippocampal synapse formation. *J Comp Neurol.* Aug 24;398(2):225-40

Spacek J, Harris KM (2004) Trans-endocytosis via spinules in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 24(17), pp.4233–4241.

Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN (2002) Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci* 5(3), pp.239–246.

Stine WB Jr, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ (2003) In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J Biol Chem* 278: 11612-11622.

Tao-Cheng JH, Dosemeci A, Gallant PE, Miller S, Galbraith JA, Winters CA, Azzam R, Reese TS (2009) Rapid turnover of spinules at synaptic terminals. *Neuroscience*, 160(1), pp.42–50.

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416(6880), pp.535–539.

Zhao WQ, Santini F, Breese R, Ross D, Zhang XD, Stone DJ, Ferrer M, Townsend M, Wolfe AL, Seager MA, Kinney GG, Shughrue PJ, Ray WJ (2010) Inhibition of Calcineurin-mediated Endocytosis and α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors Prevents Amyloid β Oligomer-induced Synaptic Disruption. *J Biol Chem* 2010 Mar 5; 285(10): 7619–7632.

.

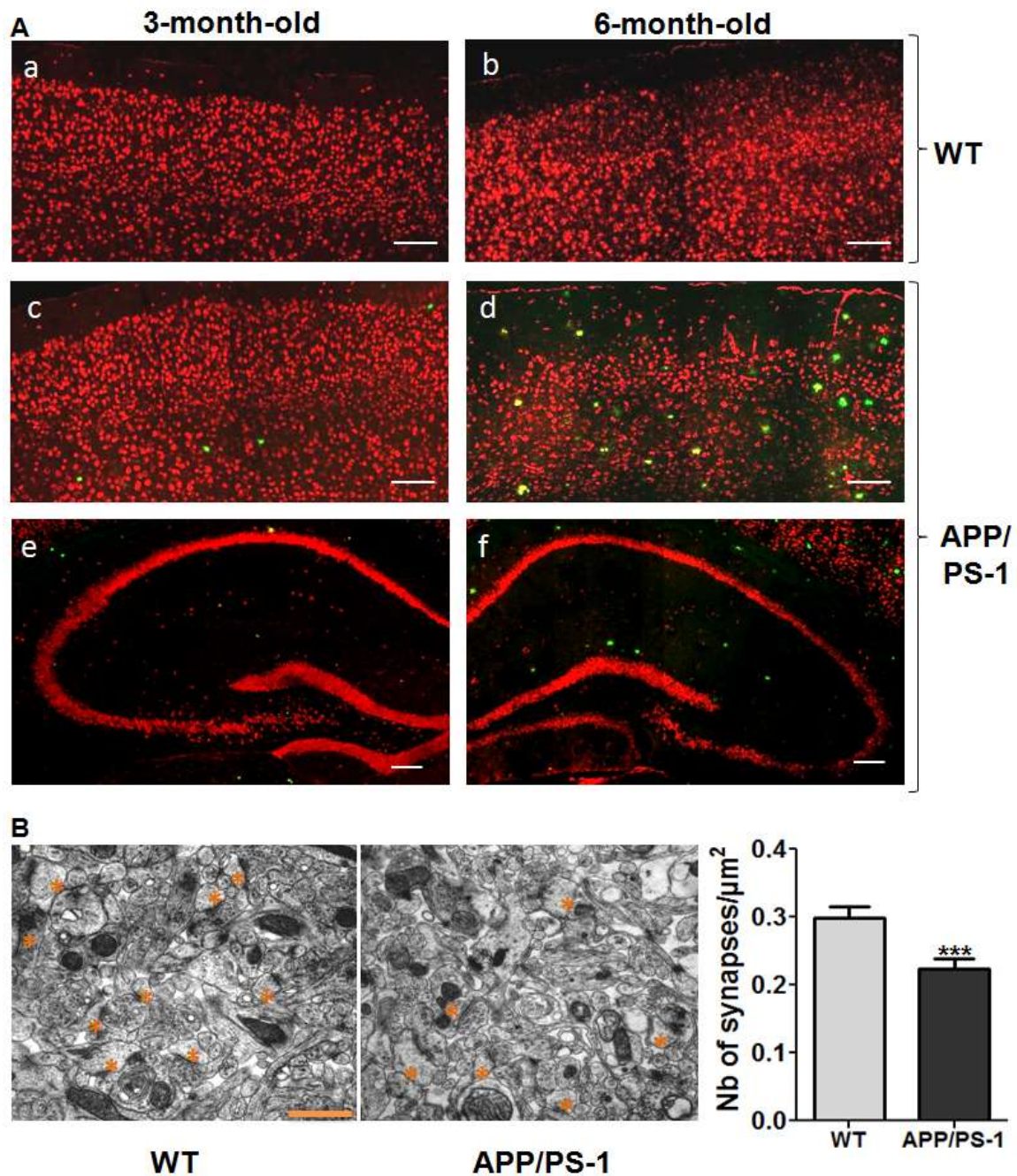


Figure 1: APP/PS-1 mice display few amyloid plaques and decreased spine density in CA1 region at 3-months-old.

A, Thioflavine-S staining for amyloid deposit (green) and neuN immunostaining (red) in the cortex (a-d) and the hippocampus (e-f) of 3 month-old (a, c, e) and 6 months-old (b, d, f) APP/PS1-21 mice showing the progression of number of amyloid deposit between 3 and 6 months in both cortex and hippocampus. No staining was identified in wild-type APP/PS1-21 mice (a, b). Scale bar: 250 μm (a, b, c & d) and 300 μm (e, f). **B**, Representative images of Wild-Type (left) and APP/PS-1 (right) synapse counting (orange asterisks) from whole fields electronographs in CA1 region. Quantification of synapse density in CA1 hippocampal regions of Wild-Type and APP/PS-1 transgenic mice (Mean \pm S.E.M). Statistical analysis: two tailed student t-test (Mean \pm S.E.M., *** $p < 0.001$, N= 12 whole fields per animal, 3 animals per genotype). Scale bar, 1 μm .

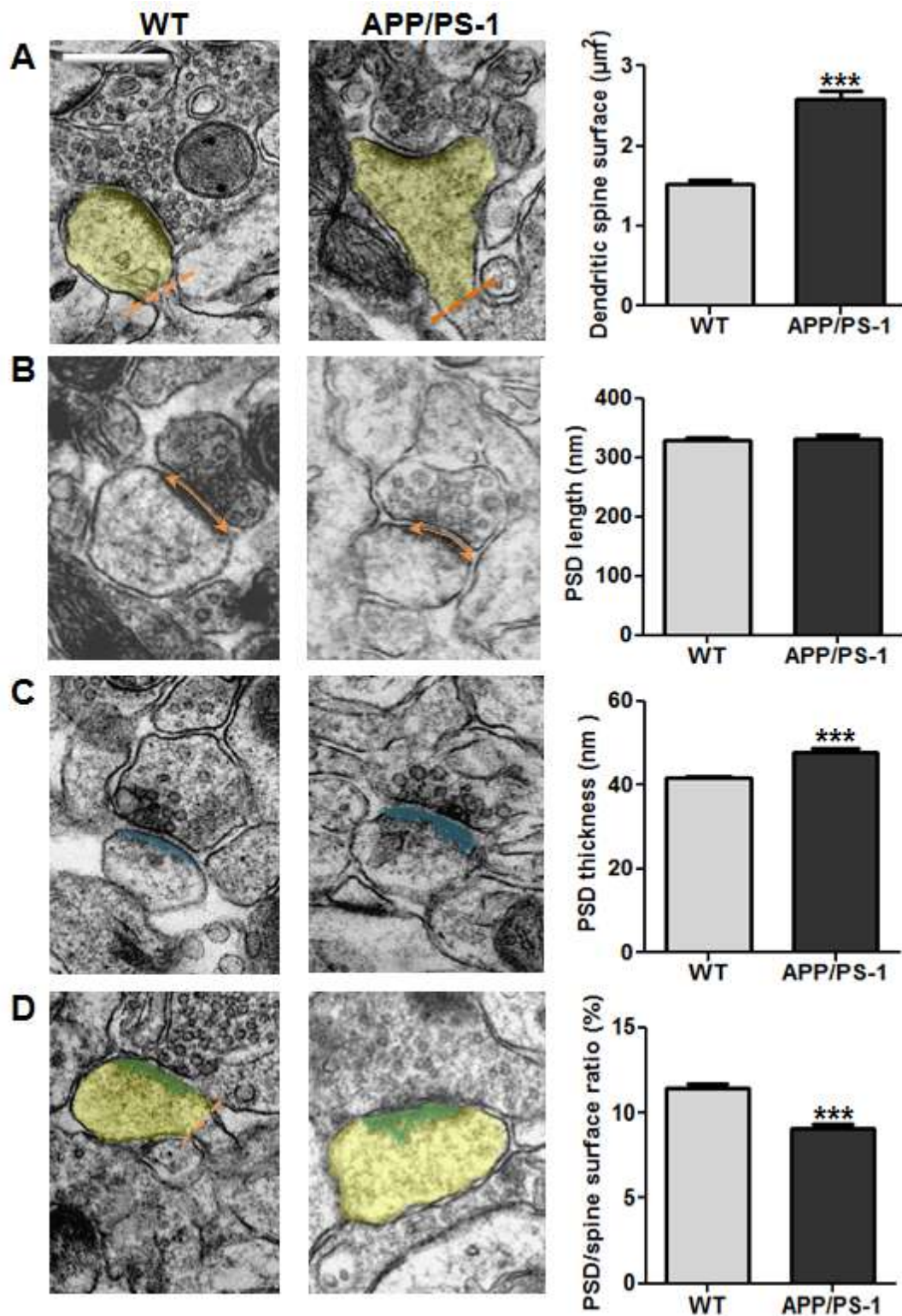


Figure 2: APP/PS-1 mice display dendritic spine morphological alterations

A, B, C, and D, representative images of dendritic spine surface (A), PSD length (B), PSD surface (C) and PSD/Spine surface ratio (D) measurements of Wild-Type (left) and APP/PS-1 transgenic mice (right) with their related quantification (Mean ± S.E.M). Scale bar: 500 nm. Statistical analysis: two-tailed student t-test (*** $p < 0.001$, $N = 600$ (Wild-Type) and 543 (APP/PS-1) analyzed synapses over 3 different animals per genotype).

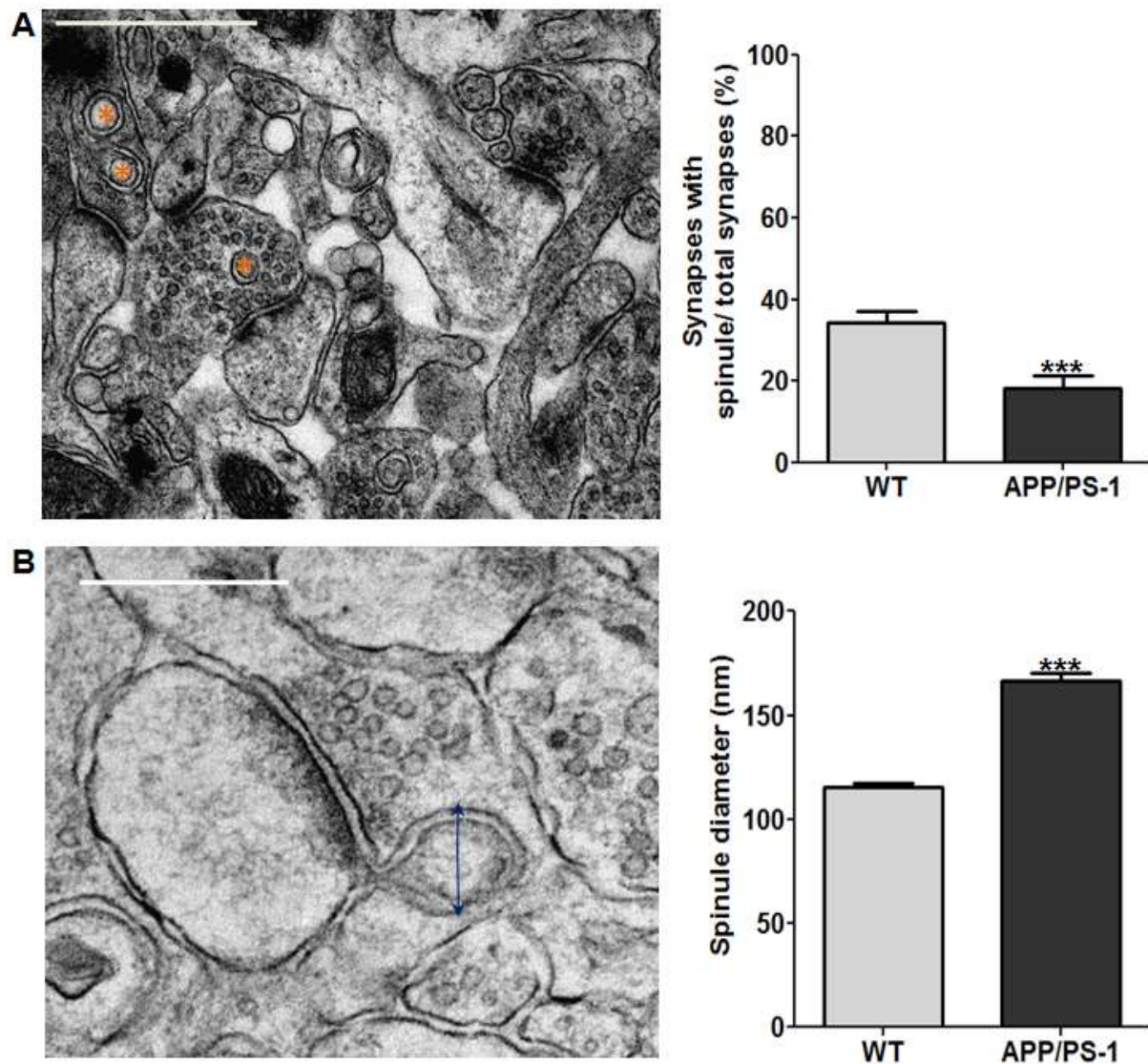


Figure 3: APP/PS-1 mice display less spinules with a larger diameter than WT littermates

A, representative image of spinule protrusion pointing towards the pre-synapse of WT CA1 mice. The graph shows quantification of spinule-positive synapses over total synapses in the CA1 region of WT and APP/PS-1 mice. **B**, representative image of spinule diameter, defined as the largest distance between external (axonal) spinule membranes in the CA1 region of WT mice. The graph shows quantification of spinule diameters in WT and APP/PS-1 mice. Scale bar, 500 nm (top) and 250 nm (bottom). Statistical analysis: **A** & **B**, two-tailed student t-test (Mean \pm S.E.M., *** $p < 0.01$, N= 600 for Wild-Type and 543 for APP/PS-1 analyzed synapses over 3 different animals per genotype).

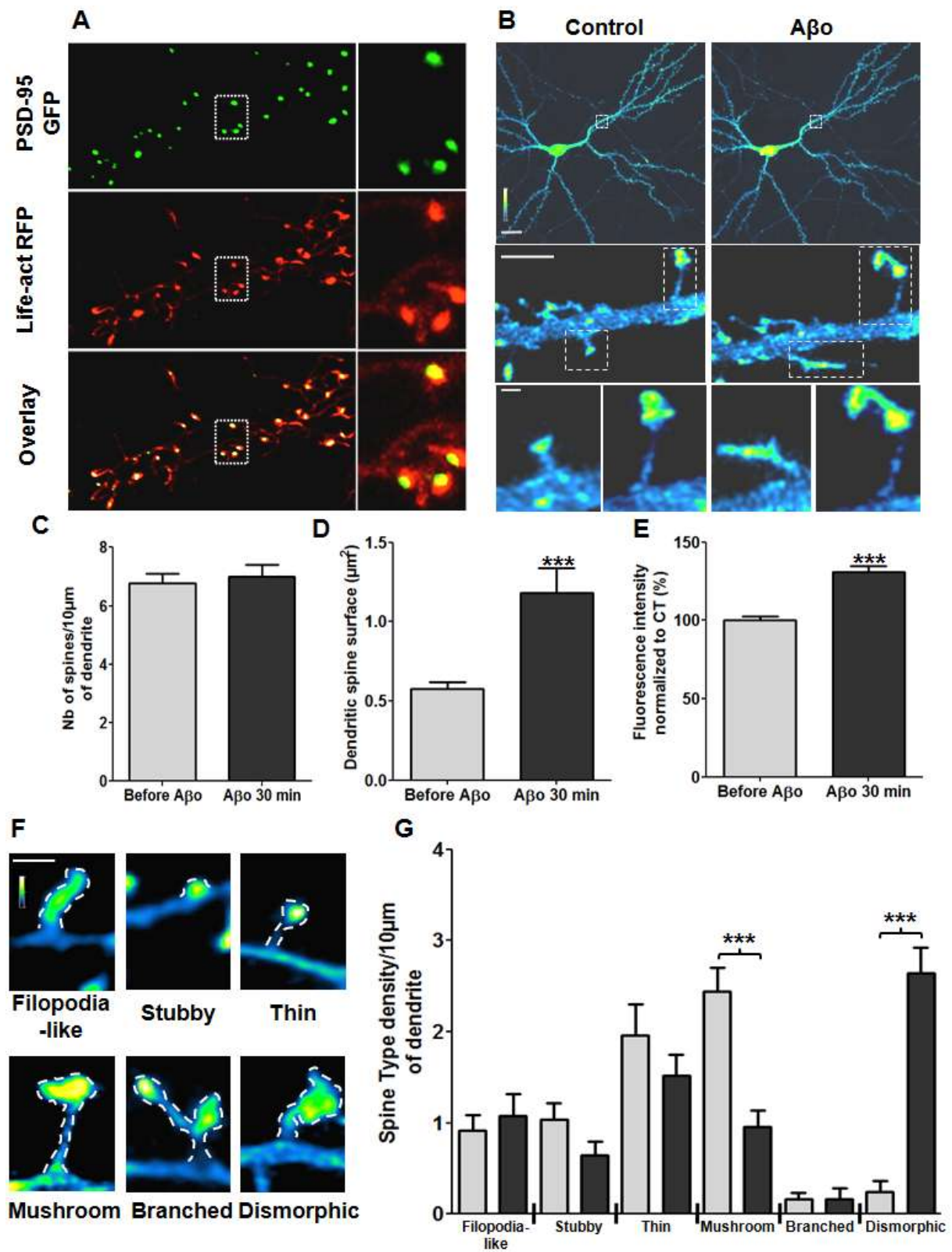


Figure 4: Acute A β treatment does not reduce spine density, increase F-actin content in spine heads which become larger, and triggers mushroom spine type switch to dysmorphic

A, representative images of PSD-95-GFP and Lifeact-RFP co-transfected cultured neurons (at DIV 12 then imaged at DIV 14.) showing colocalization of both signals at dendritic spines's top. Scale bar: 5 μ m (left) and 1 μ m (right). **B**, representative images of the same Lifeact-eGFP transfected neuron (top), dendritic section (middle) and spines (bottom) before and after A β exposure (100 nM for 30 min). Neurons were transfected at DIV12 and imaged at DIV 14. Scale bar: 10 μ m (top), 2.5 μ m (middle), 0.5 μ m (bottom). Dendritic spines were classified as F-actin enriched protrusions, pointing from the dendrite and >0.2 μ m in length. **C**, quantification of synapse number/10 μ m of dendrite and **D**, quantification of dendritic spine surface before and after A β exposure. **E**, quantification of Lifeact-eGFP related fluorescence in spine heads before and after A β exposure normalized to before A β . **C**, **D** and **E** values are expressed as Mean \pm S.E.M. Statistical analysis: two-tailed student t-test, ***p<0.001. **F**, representative illustrations of Lifeact-eGFP labeled F-actin showing immature filopodia-like and stubby spines, thin, mushroom branched and dysmorphic spines. Scale bar: 1 μ m. **G**, quantification of spine sub-type (see material and methods) density before (light grey) and after A β exposure (dark grey). Results are expressed as mean \pm S.E.M. N=169 spines (Before A β) and 175 spines (After A β) among 5 different neurons among 4 different cultures. Statistical analysis: repeated measures ANOVA followed by Bonferroni-test, ***p<0.001.

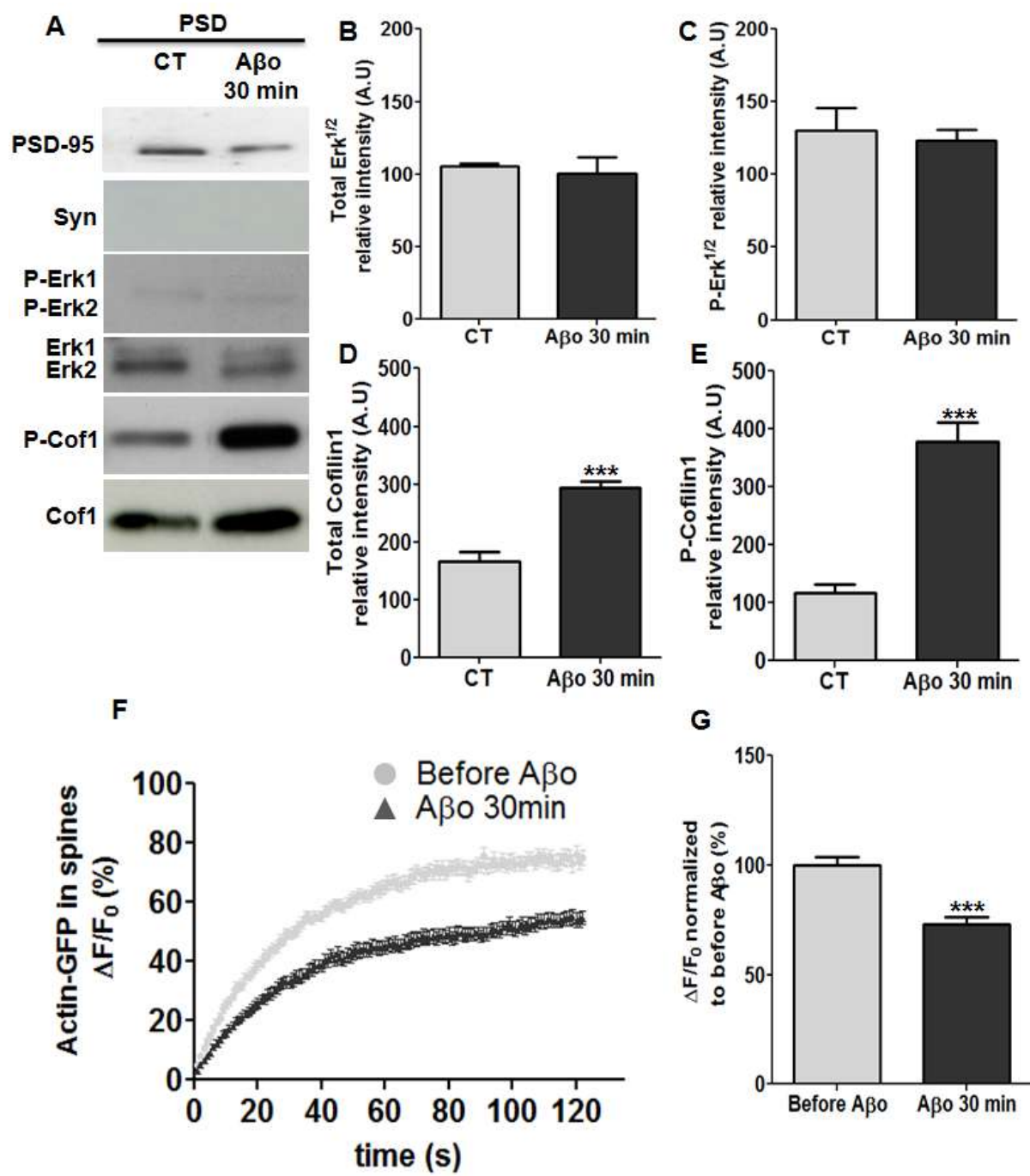


Figure 5: Acute A β treatment does not induce synaptic activation and induces Cofilin1 phosphorylation

A, representative immunoblots of PSD enriched fractions before (CT) and after A β treatment (100 nM for 30 min). The fraction purity was verified with the presence of PSD-95 and the absence of Synaptophysin. Illustration show endogenous and Phosphorylated Erk^{1/2} (Thr 202/Tyr 204), endogenous total and phosphorylated Cofilin1 (Ser3) at the PSD. Please note that each immunoblot was truncated to bring CT and A β bands closer. **B**, **C**, **D** & **E**, quantification of endogenous total (**B**) and phosphorylated (**C**) Erk^{1/2} (Thr202, Tyr 204), endogenous total (**D**) and phosphorylated (**E**) Cofilin1 (Ser3) at the PSD signals before and after A β exposure (100 nM for 30 min). Statistical analysis: 2-tailed Mann-Whitney t-test (Mean \pm S.E.M; ***p<0.001, N \geq 4 different experiments from \geq 4 different cultures.). **F**, representative FRAP curves showing Actin-GFP fluorescence recovery over time (2 min) within dendritic spines after photobleaching from transfected neurons. **G** shows Actin-GFP $\Delta F/F_0$ before and after A β exposure, and normalized to before A β (Mean \pm S.E.M, N= 52 spines over \geq 6 neurons over \geq 5 independent cultures per condition, statistical analysis: two-tailed student t-test).

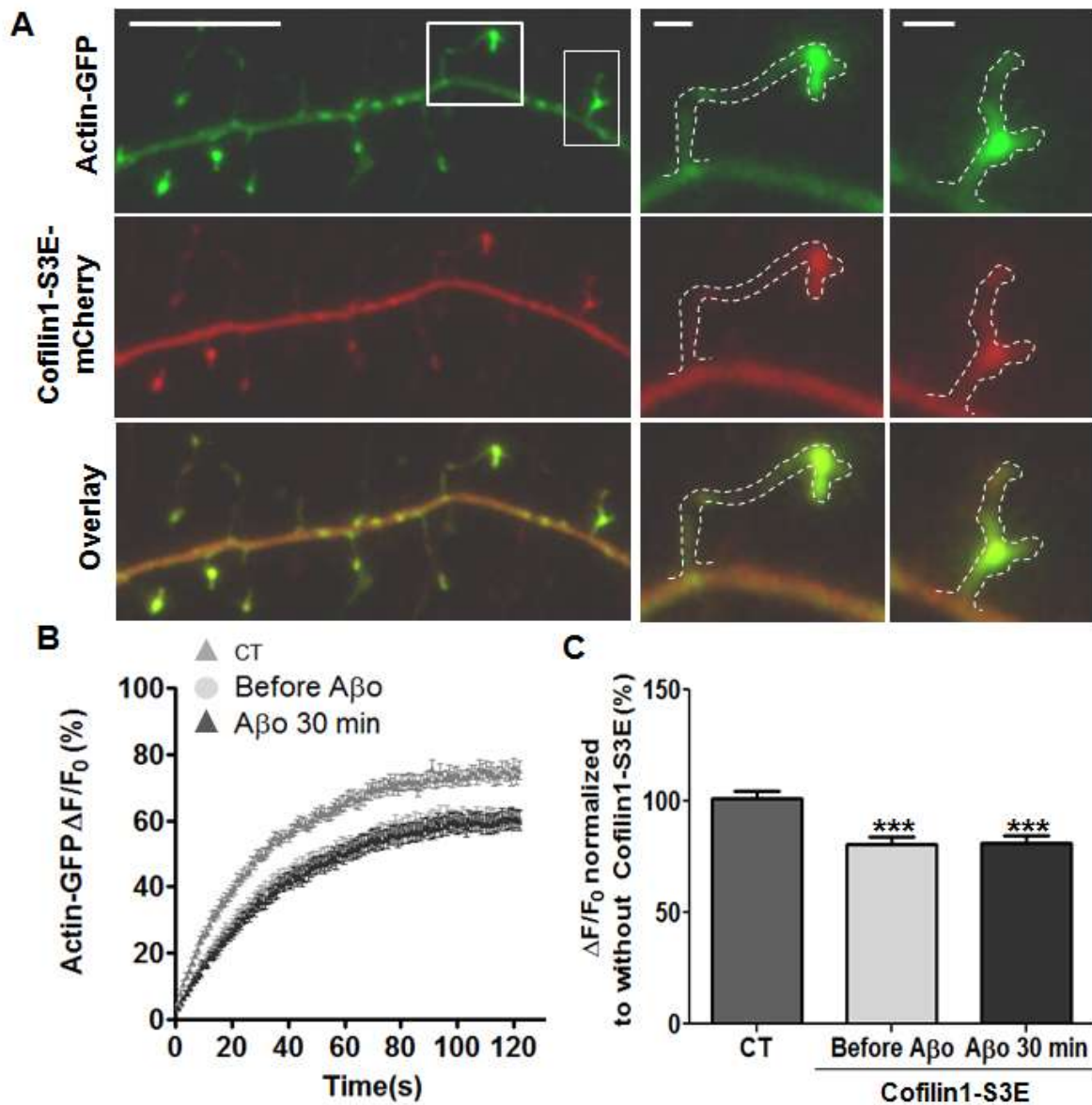


Figure 6: Actin dynamics stabilization by phosphorylated/inactivated Cofilin1 mutant does not show cumulative response after A β exposure

A, representative dendritic sections of cultured cortical neurons co-transfected with Actin-GFP and Cofilin1-S3E-mCherry under control conditions. Middle and right pictures show 2 co-transfected spines with abnormal protrusions pointing from spine's apex. Scale bar: 5 μ m (left) and 1 μ m (middle & right). **B**, representative Actin-GFP signal recovery over time after photobleaching of Actin and Cofilin1-S3E co-transfected spines. **C**, quantification of Actin-GFP fluorescence signal after bleach within dendritic spines of co-transfected cultured neurons without (CT) and with Cofilin1-S3E-mCherry mutant before and after A β exposure at 100 nM for 30min (Mean \pm S.E.M, N=52 spines over \geq 5 different neurons from \geq 4 independent cultures. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test; *, different from CT; ***p<0.001).

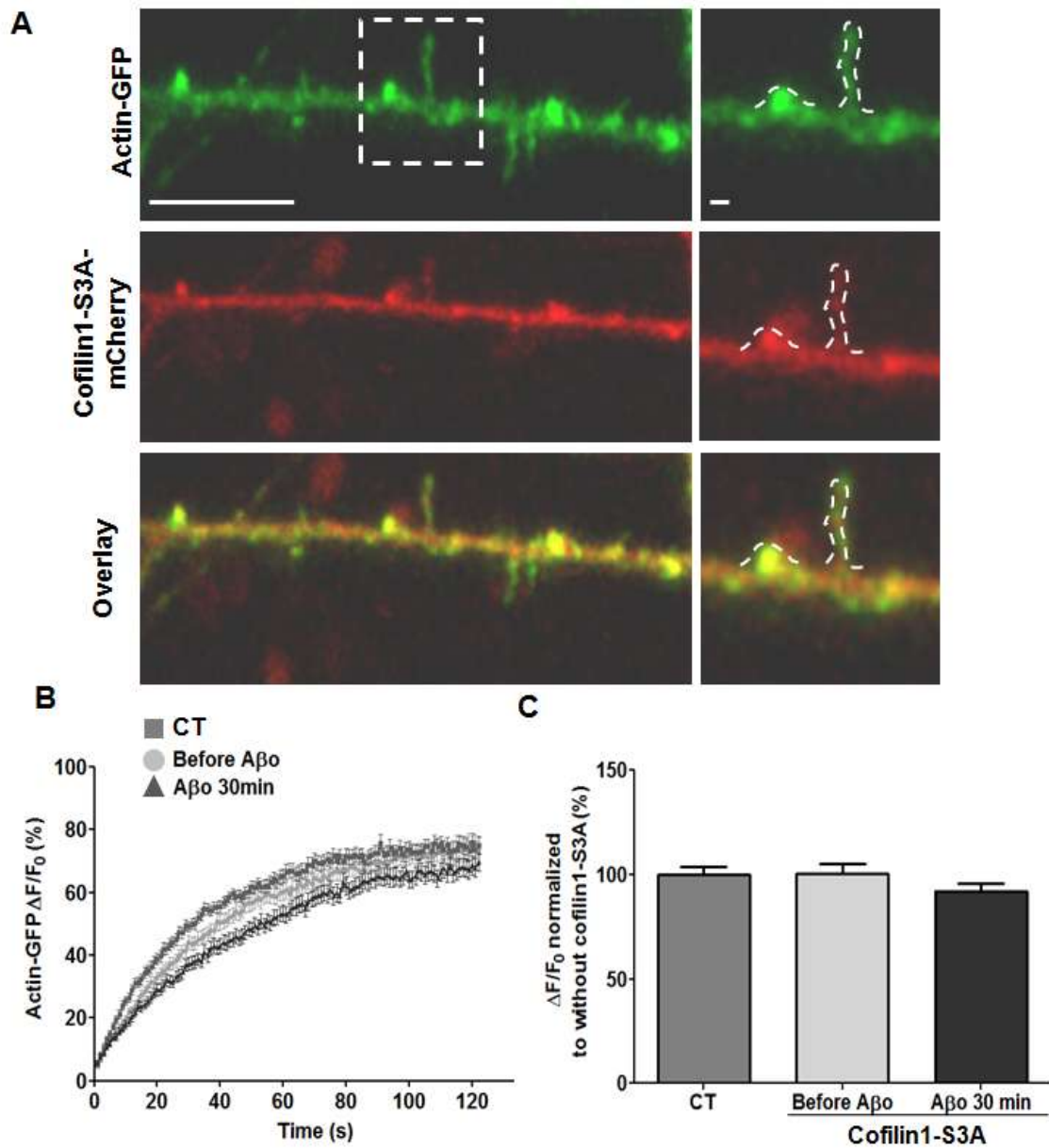


Figure 7: Acute A β exposure does not stabilize Actin dynamics within spine heads co-transfected with dephosphorylated/active Cofilin1.

A, representative dendritic sections of cultured neurons co-transfected with Actin-GFP and Cofilin1-S3A-mCherry under control conditions (left), and two immature filopodia-like and stubby spines. Scale bar: 10 μ m (left) and 1 μ m (right) **B**, representative Actin-GFP signal recovery over time before and after photobleaching of Actin and Cofilin1-S3A co-transfected spines. **C**, quantification of Actin-GFP fluorescence signal recovery after bleach within dendritic spines of co-transfected cultured neurons without (CT) and with Cofilin1-S3A-mCherry mutant before and after A β exposure at 100 nM for 30 min (Mean \pm S.E.M, $N \geq 52$ spines over ≥ 5 different neurons from ≥ 5 independent cultures. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test).

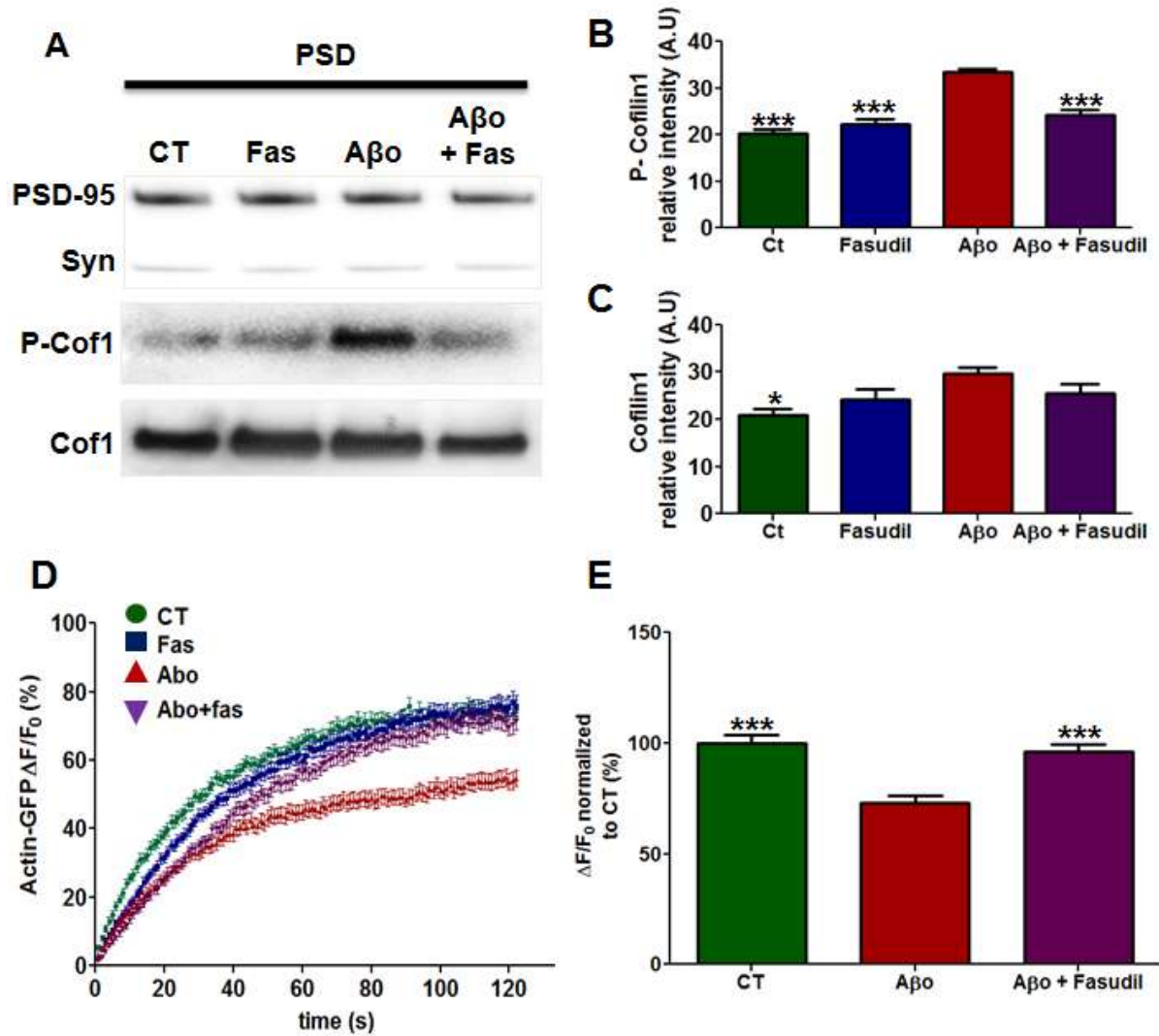


Figure 8: Rho-Kinase inhibition by Fasudil treatment abolishes Aβo induced F-actin stabilization within dendritic spines

A, representative immunoblots of endogenous total and phosphorylated Cofilin1 at the PSD under control (CT), fasudil application (100 μM for 15 min), Aβo alone (100 nM- 30 min) or prior to fasudil exposure (100 nM for 15 min + 100 μM for 15 min) and their related purity controls. **B** and **C**, quantification of endogenous total and phosphorylated Cofilin1 signals at the PSD under control (CT), fasudil application (100 μM for 15 min), Aβo alone (100 nM for 30 min) or prior to fasudil exposure (100 nM for 15 min + 100 μM for 15 min). Mean ± S.E.M, N= 4 different experiments from 4 independent cultures, * different from Aβo, *p<0.05, ***p<0.001, statistical analysis: One-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test). **D**, representative FRAP curves of Actin-GFP recovery over time after bleach within dendritic spines of transfected cultured neurons, after Aβo exposure then fasudil treatment (15+15min). Scale bar: 1 μm. **E**, quantification of Actin-GFP fluorescence signal recovery after bleach within dendritic spines of transfected cultured neurons under Control (CT), Aβo exposure alone (100 nM for 30 min) or prior to Fasudil application (15+15 min) (Mean ± S.E.M) and normalized to CT, N ≥52 spines from ≥6 different neurons over ≥5 different cultures. Statistical analysis: One-way ANOVA followed by Bonferroni-test (*, different from Aβo; ***p<0.001).

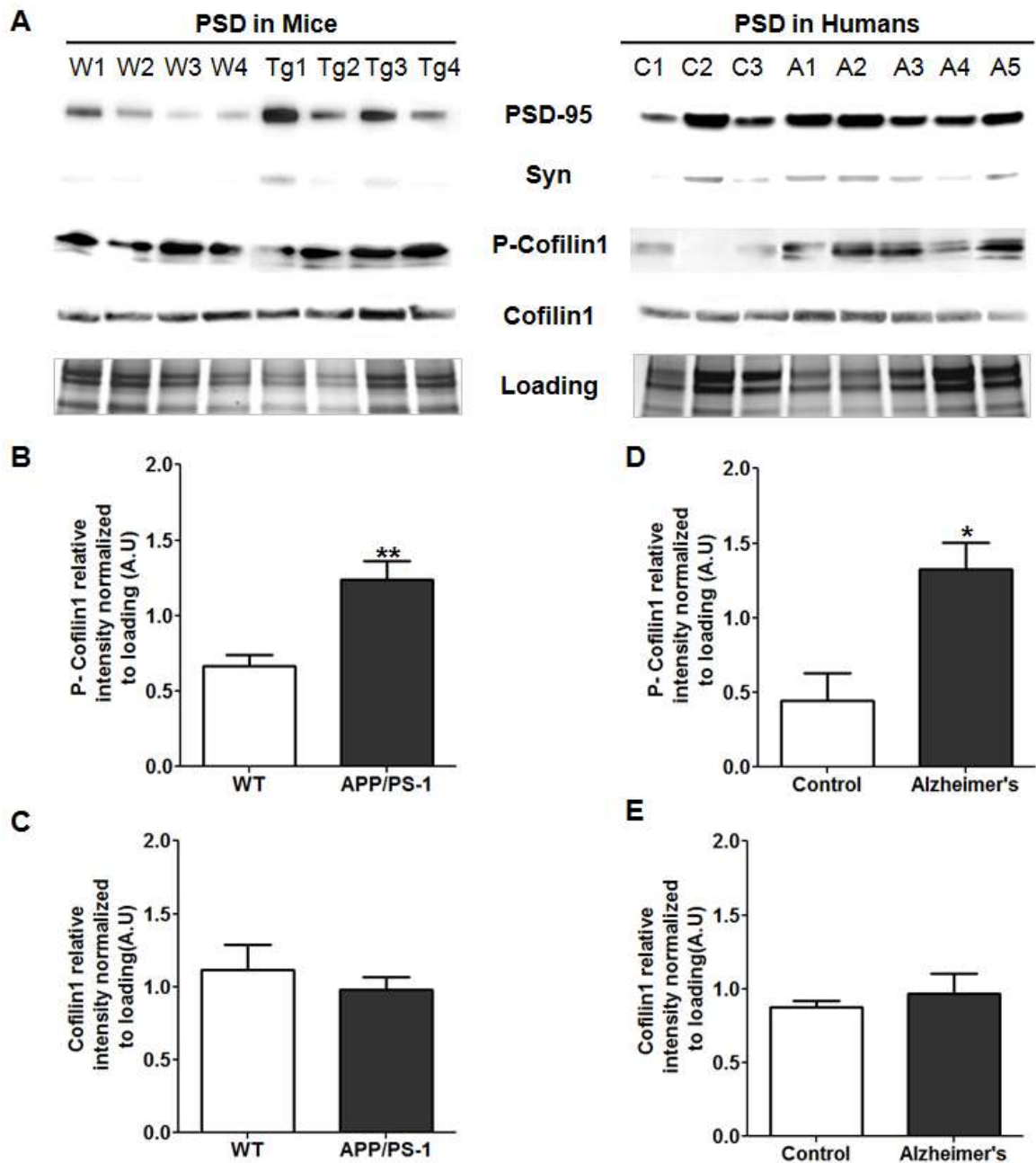


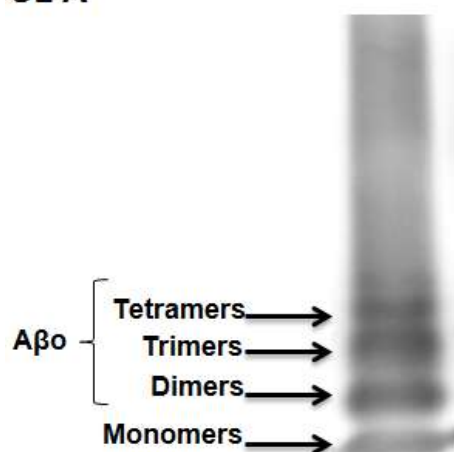
Figure 9: APP/PS-1 mice and AD human cortex contains increased phosphorylated Cofilin1 compared to WT mice and control patients

A, representative immunoblots of endogenous total and phosphorylated (Ser3) Cofilin1 at the PSD of Wild-Type (W 1 to 4) and APP/PS-1 mice (Tg 1 to 4) with their respective purity controls (PSD-95 and Synaptophysin) and related loading (left panel), as for control (C 1 to 4) and AD human cortex (A 1 to 5, right panel). Please note that each immunoblot was truncated to bring bands from the same genotype or patients' death closer

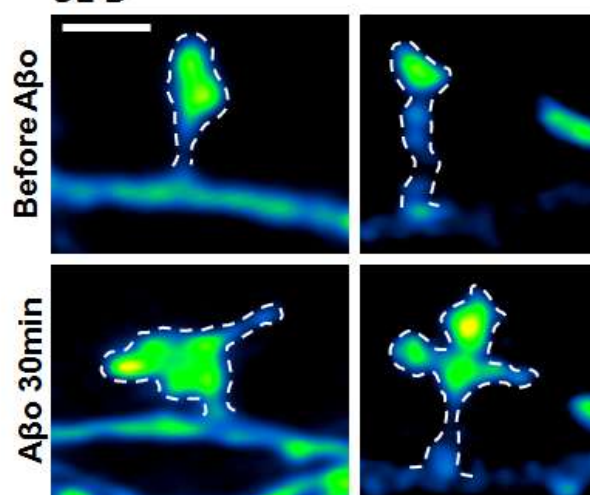
B, quantifications of total Cofilin1 signals (normalized to loading) at the PSD of Wild-Type and APP/PS-1 mice (Mean \pm S.E.M). N=9 (WT) and 11 (APP/PS-1) different animals. Statistical analysis: 2-tailed Mann Whitney t-test.

C, quantifications of phosphorylated Cofilin1 (Ser3) signals (normalized to loading) at the PSD of Wild-Type and APP/PS-1 mice (Mean \pm S.E.M). N=9 (WT) and 11 (APP/PS-1) different animals. Statistical analysis: 2-tailed Mann Whitney t-test (* p <0.05, ** p <0.01).

S1 A



S1 B



S1 C

| Spine type | Mean density/10μm (CT) | Mean density/10μm (Aβ) | Variation | P Value |
|------------|------------------------|------------------------|------------------|--------------|
| Filopodia | 0.92 ± 0.16 | 1.08 ± 0.24 | 17.39 % increase | P > 0.05(NS) |
| Stubby | 1.04 ± 0.18 | 0.64 ± 0.15 | 38.47 % decrease | P > 0.05(NS) |
| Thin | 1.96 ± 0.34 | 1.52 ± 0.22 | 22.45 % decrease | P > 0.05(NS) |
| Mushroom | 2.44 ± 0.26 | 0.96 ± 0.18 | 60.66 % decrease | P < 0.001*** |
| Branched | 0.16 ± 0.07 | 0.16 ± 0.12 | No variation | P > 0.05(NS) |
| Dismorphic | 0.24 ± 0.12 | 2.64 ± 0.29 | 1100 % Increase | P < 0.001*** |

S1 D

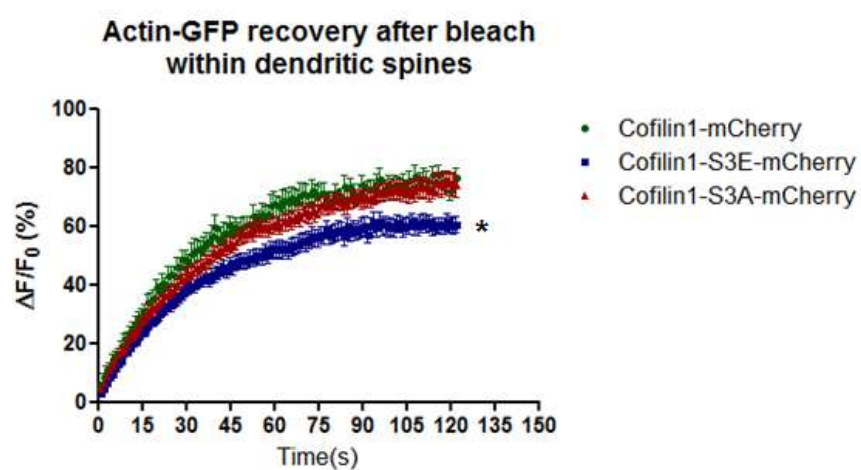


Figure S.1

A shows a representative immunoblot of A β ₁₋₄₂ oligomer species found in our preparation, which mostly contains low molecular weight A β . **B**, additional illustrations of control dendritic spines (top) becoming dismorphic following A β exposure (100 nM- 30 min, bottom). Please note the original localization of abnormal protrusions from spine head sides. **C**, summarized variations in density of all sub-types of spines before and after A β treatment in cultured cortical neurons. Results are expressed as mean \pm S.E.M. N= 169 spines (Before A β) and 175 spines (After A β) among 5 different neurons among 4 different cultures. Statistical analysis: repeated measures ANOVA followed by Bonferroni-test, ***p<0.001. **D**, representative Actin-GFP FRAP curves in cultured neurons co-transfected with either Wild-Type Cofilin1 (green), Cofilin1-S3E (blue) or Cofilin1-S3A (red). The graph shows that both Wild-Type and S3A-mCherry Cofilin1 transfected neurons display significantly higher Actin-GFP signal recovery 2 minutes after bleach, compared to S3E-cofilin1 values (Mean \pm S.E.M). N \geq 52 spines (36 for WT-Cofilin1) over \geq 5 different neurons from \geq 4 independent cultures. Statistical analysis: one-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

Chapitre 6 : Discussion

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie caractérisée par un déclin cognitif progressif incluant notamment des déficits mnésiques. Au niveau cellulaire, cette altération de la mémoire semble associée à une perte synaptique croissante et *in fine* des neurones. L'altération des synapses est donc un évènement précoce de la maladie d'Alzheimer. Au cours de la MA, les synapses sont les premiers domaines sub-micrométriques affectés par des altérations morphologiques et fonctionnelles. C'est donc pour cela qu'il est essentiel de mieux connaître les mécanismes synaptotoxiques conduisant aux déficits mnésiques. Mes travaux de thèse ont eu pour but de caractériser les atteintes morphologiques des épines dendritiques, de leur cytosquelette d'actine et notamment de sa régulation par la voie cofiline-dépendante, dans le contexte pathologique de la MA. La caractérisation d'épines altérées dans leur forme par l'A β et les mécanismes impliqués dans ce processus pourraient apporter un nouvel index de l'évaluation de la synaptotoxicité A β -dépendante.

Ainsi, nous avons démontré que l'A β entraînait une altération de la morphologie des épines, dans des cultures primaires de neurones et chez la souris APP/PS1. Cette altération se caractérise, en fluorescence, par la présence de protrusions anormales au sommet des épines et de spinules anormaux en microscopie électronique. Cet effet provient sans doute d'une dérégulation de la dynamique de l'actine synaptique par l'A β , qui entraîne la phosphorylation de la cofiline1. L'inactivation pathologique de la cofiline1 et la dynamique stabilisée de l'actine peuvent être partiellement restaurées par un traitement à l'inhibiteur de Rock : le fasudil. Ce nouveau mécanisme synaptotoxique de l'A β ouvre peut-être de nouvelles perspectives thérapeutiques pour la MA. En effet, l'hypothèse de la cascade amyloïde reprise par Haass & Selkoe (2007) implique l'assemblage de l'A β en oligomères et les atteintes synaptiques parmi les étapes précoces de la maladie. Ces altérations ont lieu en amont de la formation de plaques séniles (Haass & Selkoe, 2007). L'étude de la synaptotoxicité de l'A β dans les stades précoces de la maladie est donc capitale pour le développement de traitements,

1. Altérations morphologiques des épines chez la souris APP/PS1

Nous avons montré que chez la souris APP/PS-1, la production anormale du peptide A β (Radde et al., 2006) dans le cerveau des souris transgéniques produit une modification morphologique des synapses excitatrices. Elle se caractérise par une perte partielle des synapses associée à une augmentation de la surface des épines restantes. Cette augmentation pourrait être la manifestation d'un phénomène compensatoire, visant à améliorer l'efficacité de neurotransmission des épines persistantes. Les épines dendritiques sont des structures très dynamiques dont la forme est très variable. Bien qu'elles fassent l'objet de remodelages morphologiques permanents, les dimensions de l'épine et de la PSD restent proportionnelles (Harris, 2008). Cette relation est altérée chez la souris APP/PS-1. Malgré le fait que les épines persistantes aient une surface plus élevée avec une PSD plus épaisse, la taille de cette dernière

n'évolue plus de manière proportionnelle à la taille de l'épine et occupe proportionnellement une surface moindre. Pourtant, les perturbations du processus de LTP, et les atteintes mnésiques rencontrées chez la souris APP/PS1 n'apparaissent pas avant l'âge de 7 mois (Serneels et al., 2009 ; Gengler et al., 2010). On peut donc émettre l'hypothèse que l'augmentation de la surface des épines et l'épaississement de la PSD sont d'un point de vue mnésique suffisants pour palier à la réduction de la densité synaptique par l'A β , au moins jusqu'à 7 mois, ou alors que la variation de densité synaptique n'a pas de conséquence directe sur les capacités mnésiques en deçà d'un seuil critique.

2. Evolution des spinules en présence d'A β

Les spinules sont des évaginations de la membrane plasmique des épines qui sont internalisées par le compartiment pré-synaptique. Ils sont présents dans environ 30% des synapses et leur double membrane limitante leur confère une morphologie caractéristique. Ces compartiments ont toutefois été peu étudiés dans un contexte pathologique. Leurs mécanismes de formation et leur(s) effet(s) pré-synaptique(s) restent encore très mal compris, mais on sait qu'ils apparaissent en plus grand nombre dans un contexte de plasticité synaptique et notamment lors de l'induction de LTP (Sorra & Harris, 2000 ; Spacek & Harris, 2004 ; Tao-Cheng et al., 2009). Malgré le fait établi que l'A β induit des altérations morphologiques des épines et leur effondrement (Lacor et al., 2007 ; Shankar et al., 2007), très peu d'études ont caractérisé les modifications morphologiques des épines dans le contexte pathologique de la MA. A ce jour aucune étude ne s'est intéressée à l'impact d'A β sur le nombre et/ou la morphologie des spinules dans le cerveau des modèles animaux de la MA, ni même en culture cellulaire.

Dans cette étude, nous avons montré que chez la souris APP/PS-1, les synapses à spinules apparaissent moins fréquemment que chez la souris WT. De plus, leur diamètre moyen est anormalement élevé et leur forme ovoïde/sphérique ne s'apparente pas aux formes plutôt tubulaires/fusiformes décrites dans la littérature (Sorra & Harris, 2000 ; Spacek & Harris, 2004 ; Tao-Cheng et al., 2009). En outre, nous avons observé chez la souris APP/PS-1, un certain nombre de spinules qui étaient aussi larges que l'épine dont ils provenaient (Annexe 1), ce qui pourrait également représenter une dérégulation des phénomènes de plasticité structurale. Ainsi, la diminution de l'incidence des spinules, l'augmentation anormale de leur diamètre et leur forme atypique sont autant de raisons de croire à une modification pathologique de la morphologie des spinules. .

3. Remodelages A β -dépendants du réseau d'actine dans l'épine

Puisque les remodelages activité-dépendants de l'épine et la formation de spinules reposent sur des réarrangement du cytosquelette d'actine (De Juan & Garcia, 1998 ; Okamoto et al., 2004), nous avons voulu examiner les mécanismes responsables de la régulation du cytosquelette d'actine synaptique par l'A β . Pour visualiser de façon dynamique les variations d'actine dans l'épine, nous avons utilisé un système de culture primaire de

neurones corticaux transfectés avec le LifeAct-eGFP. Contrairement à l'analyse ultrastructurale des synapses des souris APP/PS-1, l'exposition de neurones à l'A β pendant 30 min n'induit pas de perte synaptique, mais augmente la quantité d'épines altérées dans leur structure, présentant des excroissances enrichies en actine-F et $> 0.2 \mu\text{m}$, que nous avons nommé épines dimorphiques. Nous ne pouvons pas apporter de conclusion sur la nature de ces excroissances, notamment s'il s'agit de spinules. En effet, le compartiment pré-synaptique n'a pas été mis en évidence par fluorescence, et nous ne pouvons donc pas savoir si les excroissances induites après 30 min d'exposition à l'A β sont des spinules ou non. Les excroissances présentent plusieurs similitudes avec les spinules, comme l'enrichissement en actine-F, leur localisation à l'apex de l'épine, et leur diamètre similaire. Mais nous ne savons pas si ces excroissances possèdent une double membrane plasmique et donc si elles s'insèrent dans le bouton axonal ou non. Pour répondre à cette question, il serait possible de réaliser des travaux de microscopie électronique à partir de cultures primaires de neurones traités à l'A β à 100 nM pendant 30 min, afin de pouvoir visualiser les excroissances et épines dimorphiques au niveau ultrastructural.

L'absence de variation de la densité globale des épines peut peut-être s'expliquer par un temps de traitement à l'A β sans doute trop court pour induire un effet aussi drastique qu'une exposition chronique du peptide dans le cerveau de souris transgéniques. Par ailleurs, après 24 h de traitement à l'A β , les épines les plus abondantes ne sont plus de type dimorphique mais de type filopode (Annexe 2). Ainsi, les données morphologiques acquises sur cultures cellulaires laissent penser que les épines de type dimorphique pourraient être la forme précurseur d'un processus d'effondrement synaptique. Néanmoins, nous n'avons pas examiné si la PSD est altérée sur le plan structural par l'émergence de telles protrusions, après seulement 30 min de traitement à l'A β . Toutefois, la PSD présente un marquage par le LifeAct révélant une présence importante d'actine filamenteuse. Chez la souris APP/PS-1, les spinules ne contiennent pas d'éléments denses aux électrons, donc pas d'éléments de la PSD. On peut toutefois se demander si des récepteurs AMPA et NMDA sont entraînés vers ces protrusions. Si oui, est-ce que le fonctionnement synaptique en est altéré ? Toutes ces questions méritent des études plus exhaustives et fonctionnelles des épines dendritiques.

L'analyse des épines dendritiques marquées au LifeAct-eGFP a permis de montrer qu'une exposition aigue d'A β induit une diminution ciblée des épines de type « mushroom » ainsi qu'une augmentation des épines de type dimorphique. Ces variations de sous-type d'épines n'influent pas la proportion totale d'épines. Une hypothèse est qu'un traitement aux oligomères d'A β à 100 nM pendant 30 min induise une atteinte préférentielle des épines de type « mushroom » qui deviendraient alors dimorphiques. Cela reste à confirmer par une étude longitudinale du devenir des épines sur plusieurs jours. Il faudrait notamment suivre l'évolution de la morphologie des épines après traitement avec de l'A β et déterminer pour chaque sous-type d'épine la proportion de celles devenant dimorphiques. Mais il convient de garder en tête qu'une épine dendritique est un compartiment neuronal sub-micrométrique dont les dimensions peuvent être à la limite de la résolution optique. Ainsi, il est également possible que l'A β cible en réalité tous les types d'épines, mais que les altérations structurales s'opérant sur les épines de type « stubby » par exemple soient trop subtiles pour être visibles.

en microscopie optique. L'utilisation de la microscopie à super-résolution pourrait apporter de nouveaux éléments de réponse (Cox, 2015).

4. Altération de la régulation cofiline-dépendante de l'actine-F par A β

La cofiline1 est un facteur essentiel dans le contrôle de la dynamique de l'actine dans l'épine et dans les processus mnésiques. Des études ont en effet montré l'implication de la cofiline1 dans les processus mnésiques et particulièrement dans l'induction de LTP et le recrutement des AMPAr à la PSD (Gu et al., 2010 ; Rust et al., 2010). Nos données biochimiques ont montré une augmentation de la phosphorylation/inactivation de la cofiline1 en sérine 3 suite à l'exposition au peptide A β aussi bien dans la PSD de cultures cellulaires que dans les cerveaux de souris APP/PS1 ainsi que chez les patients MA. Cette forme phosphorylée de la cofiline1 n'est plus capable d'induire la dépolymérisation de l'actine (Bernstein and Bamburg, 2010). Cette phosphorylation qui semble être aussi activité-indépendante pourrait être à l'origine des excroissances formées au sommet des épines exposées à l'A β en entraînant un excès de stabilisation du réseau d'actine.

De manière très intéressante, nous retrouvons ce morphotype d'épines, présentant une stabilisation d'actine synaptique au niveau d'épines de neurones exprimant une forme inactive (cofiline1-S3E) de la cofiline1. Ces altérations ne sont pas retrouvées sur des neurones exprimant une forme active de la cofiline1 (cofiline1-S3A). Cela suggère une implication de la phosphorylation A β -dépendante de la cofiline1 dans la perturbation de la dynamique de l'actine synaptique conduisant à des altérations morphologiques des épines. L'augmentation de la phosphorylation de la cofiline1 retrouvée aussi bien sur neurones en cultures que dans le cortex de souris APP/PS1 ou de patients MA confirme les précédents travaux de Barone et collaborateurs (2014). Pourtant, nos données à ce sujet semblent contraires à celles de Shankar et collaborateurs (2007) montrant une perte synaptique NMDAr-dépendante et impliquant une activation/déphosphorylation de la cofiline1. Ces données divergentes peuvent être imputables :

- à des différences dans les temps de traitement aux oligomères d'A β : (de 5 à 15 jours vs 30 min dans notre étude)
- à l'origine des oligomères utilisés (de surnageant de cellules surexprimant l'APP₇₅₁ vs synthétiques dans notre étude)

Il est possible que phosphorylation et déphosphorylation de la cofiline1 se produisent de manière séquencée au niveau synaptique dans la MA. On peut ainsi suggérer que l'exposition d'A β induirait dans un premier temps une phosphorylation anormale de la cofiline1, qui serait ensuite anormalement déphosphorylée dans des étapes plus tardives de la synaptotoxicité A β -dépendante.

5. Implication de la voie RockII/Lim-k1/cofiline1 dans la synaptotoxicité A β -dépendante

Nos résultats ont montré que les modifications morphologiques des épines A β -dépendantes étaient également [KPG1] associées à une réorganisation du cytosquelette d'actine sur la forme d'actine-F plus stable. Nous avons montré par les techniques de western-blot et de FRAP que cette stabilisation des filaments d'actine est en corrélation avec une augmentation de la forme phosphorylée (serine 3) de la cofiline1. La cofiline est essentiellement phosphorylée par la lim-k, elle-même en partie phosphorylée par la Rho-kinase ou Rock. L'utilisation de fasudil (un inhibiteur de Rock) est suffisante pour diminuer le taux de cofiline1 phosphorylée et augmenter la dynamique de l'actine en présence d'A β , ce qui confirme une implication de la voie RockII/Lim-k1/cofiline1 dans les atteintes morphologiques des épines dendritiques par A β . Ce résultat nous amène à proposer que les modifications morphologiques des synapses observées sur les neurones en présence d'A β seraient dues à une inactivation pathologique de la cofiline1.

Cette modification de l'organisation du cytosquelette d'actine synaptique pourrait être à l'origine des perturbations synaptiques fonctionnelles qui caractérisent les stades précoces de la MA. Ce point devra être étudié afin de valider l'intérêt thérapeutique des inhibiteurs de la voie Rock dans le traitement de cette pathologie. Néanmoins, le fasudil n'est pas un inhibiteur spécifique de Rock. Bien que l'IC₅₀ du fasudil envers Rock soit de 1,9 μ M (Davies et al., 2000), le fasudil inhibe avec une efficacité moindre plus d'une trentaine de protéines kinases différentes parmi lesquelles figurent la PKA, la PKC et GSK3 β , entre autres (Davies et al., 2000). Ainsi, la poursuite de cette étude concernant l'implication de la voie RockII pourrait nous mener à l'utilisation du Pyr1, un inhibiteur de la lim-k1/2 (Prudent et al., 2012). En inhibant de façon plus précise la phosphorylation de la cofiline1 par inhibition de la Lim-k1, l'implication de la voie RockII/Lim-k1/cofiline1 pourrait être confirmée.

6. Agent causal : A β intra ou extracellulaire ?

Les hypothèses présentées dans ce travail reposent sur un rôle régulateur d'A β extracellulaire *via* une interaction avec une protéine transmembranaire. Nos travaux soutiennent donc l'idée d'une interaction indirecte entre actine-F et A β par voie de signalisation. Parmi le spectre de récepteurs potentiels à l'A β , les intégrines (Wang et al., 2008) semblent des candidats potentiels dans les effets synaptotoxiques que nous avons montré. En effet, les intégrines peuvent induire le recrutement d'actine en points d'adhésion focale. Cet effet peut impliquer l'ILK (Integrin Linked Kinase) qui peut elle-même moduler la signalisation Rho-GTPase (Kogata et al., 2009) et donc l'activité de la cofiline. On peut donc suggérer l'éventualité d'une implication des intégrines et de l'ILK dans la phosphorylation A β -dépendante de la cofiline1. Cependant nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'un rôle d'A β au niveau intracellulaire en se liant directement à l'actine. L'A β intracellulaire résulterait d'une endocytose/diffusion de l'A β extracellulaire. Des expériences en cours de publication réalisées par Léveillé et collaborateurs montrent qu'en précipitant l'actine-F de

lysats de cultures de neurones incubés avec de l'A β o, ce dernier était récupéré dans la fraction d'actine-F immunoprécipitée (Annexe 3.A). Cela suggère une interaction d'A β o avec l'actine, qu'elle soit directe ou à l'aide d'un partenaire.

Par ailleurs, nous avons réalisé au cours de ma thèse des expériences *in vitro* soutenant cette théorie. En incubant de l'actine en milieu favorable à la polymérisation, des filaments se forment et se rassemblent en macro-structures lorsque de l'A β o est ajouté au milieu (Annexe 3.B). De plus, la dilution au 1/10^{ème} du milieu sensée induire un désassemblage des filaments n'affecte pas ces structures d'A β o-actine qui persistent (Annexe 3.C). Ces résultats soutiennent l'idée que l'A β o interagisse directement avec l'actine-F et la stabilise. Une action directe et indirecte de l'A β o sur l'actine-F peut donc être envisagée.

Un outil pouvant apporter des éléments de réponse sur la provenance d'A β o intracellulaire et son mode d'action est l'utilisation d'A β o oxydé sur son résidu Méthionine-35 (A β -Met₃₅-O). Cette oxydation empêche l'A β o de franchir les membranes cellulaires (Barnham et al., 2003). L'utilisation d'A β -Met₃₅-O permettrait de comprendre si l'accumulation intracellulaire d'A β o est nécessaire à ses mécanismes synaptotoxiques. Il conviendra cependant de pondérer les résultats obtenus par l'utilisation d'A β -Met₃₅-O. En effet, on ne sait pas pour le moment si l'A β -Met₃₅-O peut interagir avec le même nombre de récepteurs transmembranaires potentiels de son homologue non-oxydé, ni de la même façon.

7. Altération possible de la voie activatrice de la Cofilin1 par A β o via slingshot

De nombreuses données démontrent le rôle primordial de la régulation de la phosphorylation de la cofiline1 comme point de convergence dans les voies de signalisation qui relient les stimuli extracellulaires à la dynamique du cytosquelette d'actine (pour revue Mizuno, 2013). Le couple Lim-k1 et la phosphatase slingshot (SSH) est un des acteurs principaux de cette régulation. Des travaux portant sur l'étude du taux de SSH phosphorylée dans les fractions PSD des souris APP/PS1 et des patients Alzheimer sont en cours. Par ailleurs les travaux d'Erica Barone et collaborateurs (2014) ont montré une augmentation de la forme phosphorylée de SSH chez la souris APP/PS-1 et chez les patients atteints de MA, qui augmente avec l'âge. Or sous sa forme phosphorylée, SSH ne peut plus exercer son activité phosphatase sur la cofiline1, qui reste inactive vis-à-vis de l'actine-F. Ainsi, il se pourrait que la dérégulation de la cofiline par A β o provienne à la fois d'une activation de la voie inhibitrice de la cofiline par RockII, mais également d'une inhibition de la voie activatrice de la cofiline par slingshot. L'action synergique de ces 2 voies conduirait à l'inactivation de la cofiline1.

De plus, il a été montré *in vitro* que SSH possède des propriétés intrinsèques, contraires et indépendantes à la cofiline (Kurita et al., 2007). En effet, la protéine SSH peut également se fixer aux filaments d'actine, les stabiliser et les assembler en faisceaux. Cette activité indépendante de l'activité cofiline-phosphatase pourrait impliquer la forme phosphorylée de

SSH (Mizuno, 2013). Paradoxalement, la liaison de SSH à l'actine augmente son activité cofiline-phosphatase (Kurita et al., 2008), ce qui suggère qu'une séquestration spatiale de SSH phosphorylée dans l'épine est nécessaire au contrôle de cette voie de signalisation. La phosphorylation de SSH peut être induite par les protéines kinases PKD ou GSK3 directement sur la SSH liée à l'actine-F. L'isoforme β de la GSK3 a d'ailleurs été montrée comme phosphorylée par l'A β o (Dolan & Johnson, 2010). Sous sa forme phosphorylée aux résidus sérine 937 et/ou 978, SSH1 est séquestrée dans le cytosol par la protéine 14-3-3 qui se lie à SSH1 près d'un des sites de liaison à l'actine (Nagata-Ohashi et al., 2004 ; Figure 38).

Comment l'A β o pourrait-il réguler l'activité de SSH ? Il a été proposé que l'exposition de neurones en culture à l'A β o puisse induire une activation de SSH et de la cofiline après interaction avec une intégrine à sous-unité β 1. Cette activation résulterait de la dissociation de SSH de la protéine 14-3-3 (Woo et al., 2015). Dans ces conditions, on s'attend à une augmentation de la dépolymérisation de l'actine et une diminution du taux de phospho-cofiline ce qui est contraire à nos observations. Dans notre modèle, nous proposons que le traitement par l'A β o puisse (Figure 38):

- induire la phosphorylation de SSH par GSK3 β , et inhiber ainsi son activité cofiline-phosphatase ;
- augmenter la séquestration de la protéine SSH par la protéine 14-3-3 et empêcher sa liaison à l'actine-F. Il a été montré que le traitement par l'A β o pouvait augmenter l'expression de la protéine 14-3-3. On peut émettre l'hypothèse que l'A β o puisse également favoriser son recrutement au niveau de l'épine, et donc la séquestration de slingshot phosphorylée.

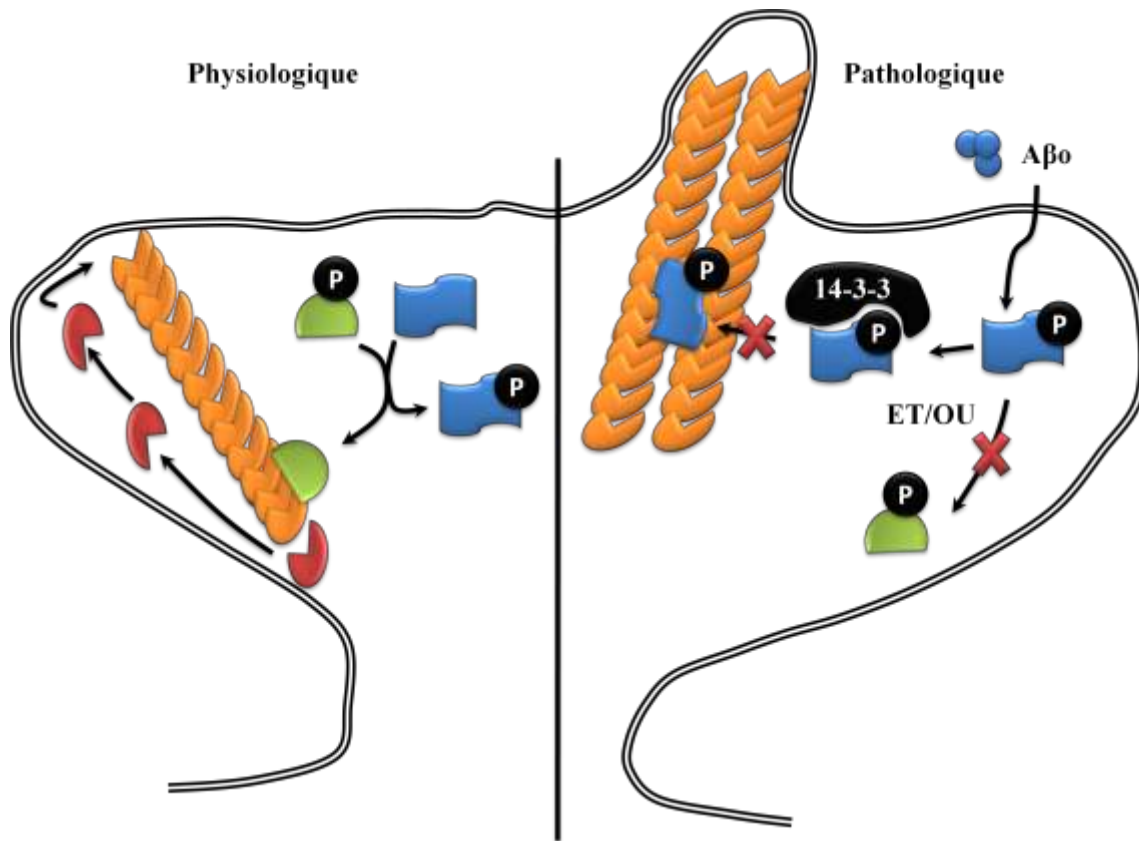


Figure 38 : Phosphorylation de slingshot induite par A β o : elle pourrait contribuer au cercle vicieux d'altération de l'actine dans l'épine dendritique.

Schéma mécanistique montrant la possible dérégulation de slingshot (drapeau bleu) par A β o. En conditions physiologiques, slingshot déphosphoryle la cofiline1 (hémi disque vert) qui peut se lier à l'actine-F et induire sa dépolymérisation. Ce phénomène contribue à la dynamique intrinsèque de l'actine, permet le renouveau des filaments et maintient un pool d'actine-G pour répondre à d'éventuels besoins de remodelage du cytosquelette. En conditions pathologiques la phosphorylation de la cofiline1 par A β o induit la stabilisation et l'allongement des filaments d'actine. L'éventuelle phosphorylation de slingshot en présence d'A β o inhibe son activité cofiline-phosphatase et/ou la maintient inhibée et séquestrée à l'épine par la protéine 14-3-3. Inspiré de Kurita et al., 2007, 2008 ; Dolan & Johnson, 2010 ; Mizuno, 2013.

8. Modèle hypothétique d'effondrement synaptique : implication de tau

La phosphorylation de la cofiline sur son résidu sérine 3 est la principale voie de régulation de l'enzyme. Nous avons montré que l'A β o induit une phosphorylation de la cofiline1 non-couplée à une activation synaptique. Nous avons également constaté sur des neurones en culture que l'A β o stabilise l'actine et induit la formation de protrusions enrichies en actine-F. Ces protubérances sont longitudinales/fusiformes pour la plupart, mais il nous est déjà arrivé de visualiser des protrusions particulièrement épaisses (> 150 nm de diamètre), ou d'autres formant un coude. De telles structures d'actine-F pourraient impliquer d'autres ABP qui seraient également dérégulées, et permettraient la formation de ces structures en faisceaux par exemple.

Des précédents travaux réalisés dans notre équipe ont montré que dans les mêmes conditions, l'incubation d'A β o (100 nM-30 min) sur neurones en culture induit une translocation de la protéine tau au niveau de l'épine, où cette dernière pourrait rassembler les filaments d'actine en faisceaux (Frandemiche et al., 2014). On peut suggérer ainsi que la phosphorylation de la cofiline par l'A β o s'accompagne également d'un recrutement de tau à l'épine qui pourrait alors contribuer au cercle vicieux d'altération de l'actine-F, en participant à la stabilisation et à l'organisation anormale des filaments d'actine dans l'épine. Basé sur ces données, nous proposons un mécanisme synaptotoxique en 4 étapes, aboutissant à l'effondrement de l'épine (Figure 39), qui bien entendu reste à confirmer sous de nombreux angles.

Dans la première étape l'exposition synaptique d'A β o induit une phosphorylation de la cofiline1 au niveau apical de l'épine, ce qui induirait une stabilisation et un allongement progressif de l'actine-F située au sommet de l'épine. Cet effet se manifesterait par l'apparition de protrusions enrichies en actine-F. Tau participerait à ce processus en s'associant aux filaments, en les stabilisant et en les rassemblant en faisceaux.

La seconde étape pourrait se caractériser par une phosphorylation de la cofiline1 généralisée à l'ensemble de la tête de l'épine. La majorité de l'actine serait alors en conformation filamenteuse et pourrait être organisée en faisceaux par tau. La diminution du pool d'actine-G pourrait entraîner un gradient spontané d'actine monomérique, depuis le bout (-) des filaments du cou jusqu'au bout (+) des filaments de la tête et surtout des protrusions.

La troisième étape se caractériserait par l'exacerbation du phénomène de stabilisation d'actine-F, entraînant une déstructuration de la séparation dendrite-cou-tête. Le cou perdrait son rôle de compartimentation électrique et biochimique de la tête et contribuerait ainsi aux altérations de l'efficacité de la neurotransmission synaptique par A β o. L'épine prendrait alors une forme similaire à un filopode, qui se distinguerait de cette variété d'épines immatures par cytosquelette d'actine particulièrement stable et rigide.

Dans la dernière étape, la majeure partie de l'actine de l'épine serait incluse dans les structures anormales. L'épine perdrait alors totalement sa forme originelle, et les macro-structures d'actine diffuseraient dans la dendrite où elles y seraient éliminées. Ce phénomène

pourrait peut-être expliquer la présence d'épines en forme de filopodes visibles 24h après exposition à l'A β o (Annexe 3), et expliquerait l'effondrement des épines et donc la perte synaptique dans la maladie d'Alzheimer.

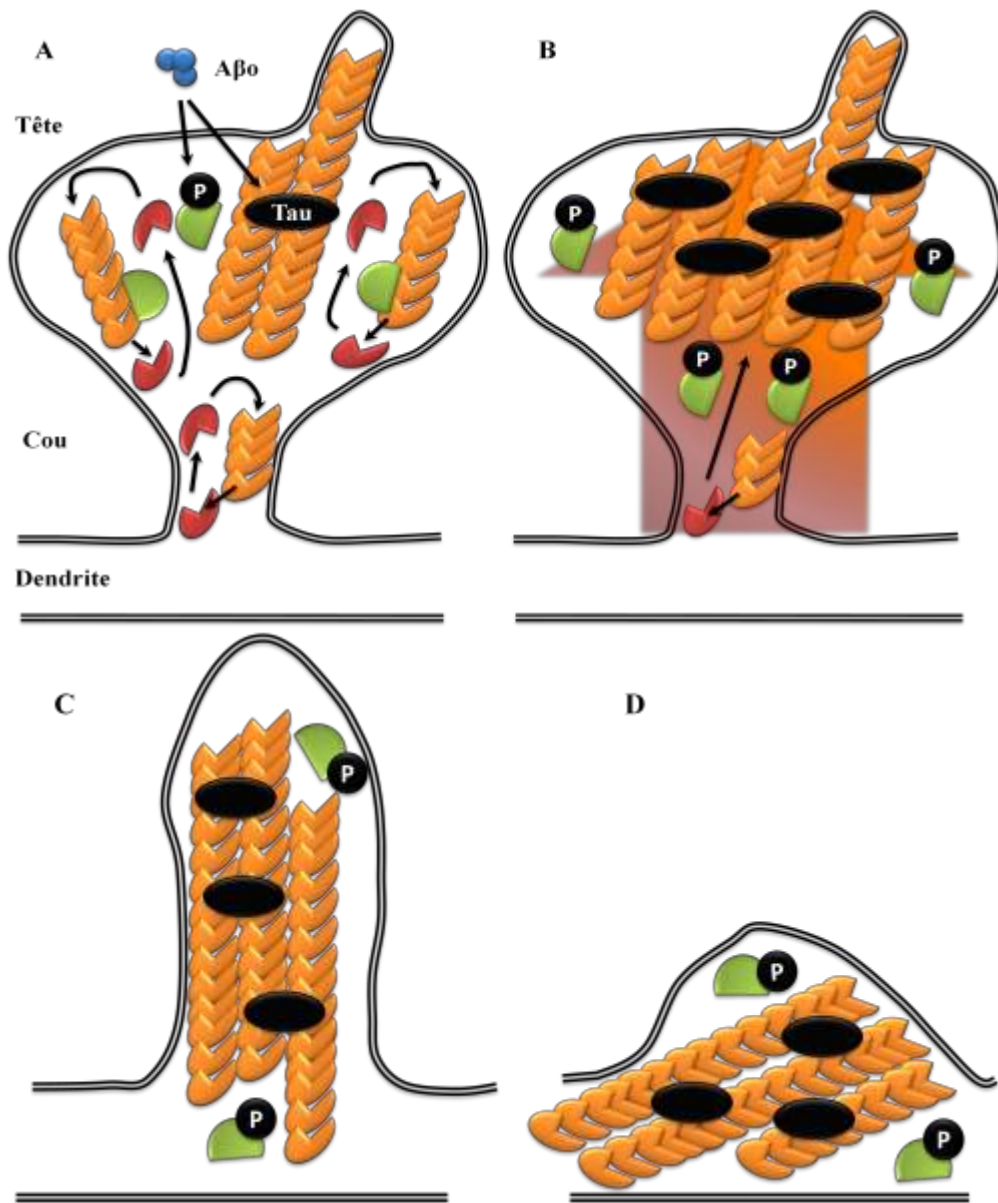


Figure 39 : mécanisme hypothétique de synaptotoxicité A β o-cofiline1-Tau dépendante

Schéma hypothétique de synaptotoxicité A β o-dépendante. Dans un premier temps, l'exposition d'A β o induit une phosphorylation de la cofiline1 au niveau apical de l'épine (A) et un recrutement de Tau, ce qui induit une stabilisation et un allongement des filaments, qui sont rassemblés en faisceaux au travers de protubérances. L'altération synaptique de la cofiline1 et de tau se généralise (B) et la majeure partie de l'actine de la tête est sous forme filamenteuse, ce qui génère un gradient d'actine-G depuis le cou vers le sommet de la tête de l'épine et des protrusions. Puis, l'exacerbation de ce phénomène entraîne une rupture de la compartimentation dendrite-tête-cou, nuisant davantage à l'efficacité de neurotransmission (C). Finalement, les structures d'actine n'étant plus séquestrées dans l'épine sont rapatriées et peut-être éliminées dans la dendrite, ce qui induit à terme l'effondrement de l'épine et donc une perte synaptique.

Chapitre 7 : Perspectives

1. La cofiline dans les autres maladies neurologiques

En accord avec les travaux de Lacor et collaborateurs (2007), nous avons montré qu'une exposition de neurones en culture à l'A β induit une altération de la morphologie des épines dendritiques, phénomène également vu chez la souris APP/PS1. La dérégulation morphologique n'est pas un phénomène retrouvé uniquement dans la MA, mais aussi dans d'autres désordres neurologiques comme le syndrome de Down (Haas et al., 2013), le syndrome FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein ; Chang et al., 2013), ou encore plusieurs formes d'autisme (Penzes et al., 2011). Le syndrome de Down se caractérise notamment par la présence de plaques amyloïdes (Glenner & Wong, 1984) analogues à celles retrouvées dans le cerveau de patients atteints de MA. Ces similitudes suggèrent qu'un ou plusieurs mécanismes synaptotoxiques de l'A β pourraient se produire dans ces deux pathologies. Il est donc possible que l'activité de la cofiline1 soit également altérée dans le syndrome de Down, ce qui pourrait expliquer les anomalies morphologiques des épines rencontrées dans cette pathologie.

2. Les spinules : un index de plasticité structurale sous-estimé

Les spinules constituent un moyen de communication interneuronal, par exemple de l'épine vers le bouton axonal. Ils ont été découverts en 1962 par Westrum et Blackstad mais ont été peu étudiés, bien qu'ils soient présents dans un tiers des synapses de l'hippocampe. Ces structures ont un diamètre de l'ordre de la centaine de nanomètre, elles sont donc peu visibles en microscopie optique et ont donc suscité peu d'engouement de la part de la communauté scientifique. La présence des spinules augmente sous activation synaptique pharmacologique et sous LTP (Toni et al., 1999 ; Richards et al., 2005 ; Tao-Cheng et al., 2009). Leur rôle reste peu connu et sujet à débat. Pourtant, dans leur étude, Tao-Cheng et collaborateurs ont mis en évidence un phénomène de bourgeonnement vésiculaire depuis le spinule (Annexe 4). La formation de ces vésicules n'impliquerait que la membrane externe/pré-synaptique du spinule, soit celle provenant du bouton axonal. Dans notre étude, chez la souris WT, nous avons remarqué quels rares cas où ce phénomène se produisait (Annexe 4). La faible incidence de ce cas particulier peut s'expliquer par la nature labile des spinules. Néanmoins, si la présence des spinules est liée à l'activité synaptique, et qu'ils peuvent eux même être le siège de bourgeonnements vésiculaires, on peut se questionner quant à l'utilité de ce phénomène. Si la formation de vésicules n'implique que la membrane externe/pré-synaptique du spinule, on peut suggérer que la formation de spinule soit impliquée dans le recyclage en masse d'éléments pré-synaptiques par des moyens stériques.

Puisque la PSD de l'épine et l'épine elles mêmes changent de forme en contexte de LTP, la formation de spinules pourrait peut-être aider à coupler remodelages morphologiques

pré- et post-synaptiques. Ainsi, les spinules sont peut-être sous évalués par la communauté scientifique. Bien qu'ils méritent des études exhaustives, les variations de leur présence pourraient constituer un index supplémentaire de plasticité structurale à exploiter. Par ailleurs, nous avons montré que chez la souris transgénique APP/PS1, les synapses et les spinules étaient altérés dans leur structure. Or, les épines dimorphiques sont également retrouvées dans d'autres pathologies neurologiques (Haas et al., 2013). Il est ainsi possible que des spinules anormaux puissent être retrouvés dans le cerveau de malades atteints du syndrome de Down. Les spinules pourraient donc constituer un référentiel à part entière de plasticité structurale, mais également un moyen de mise en évidence d'altérations morphologiques synaptiques.

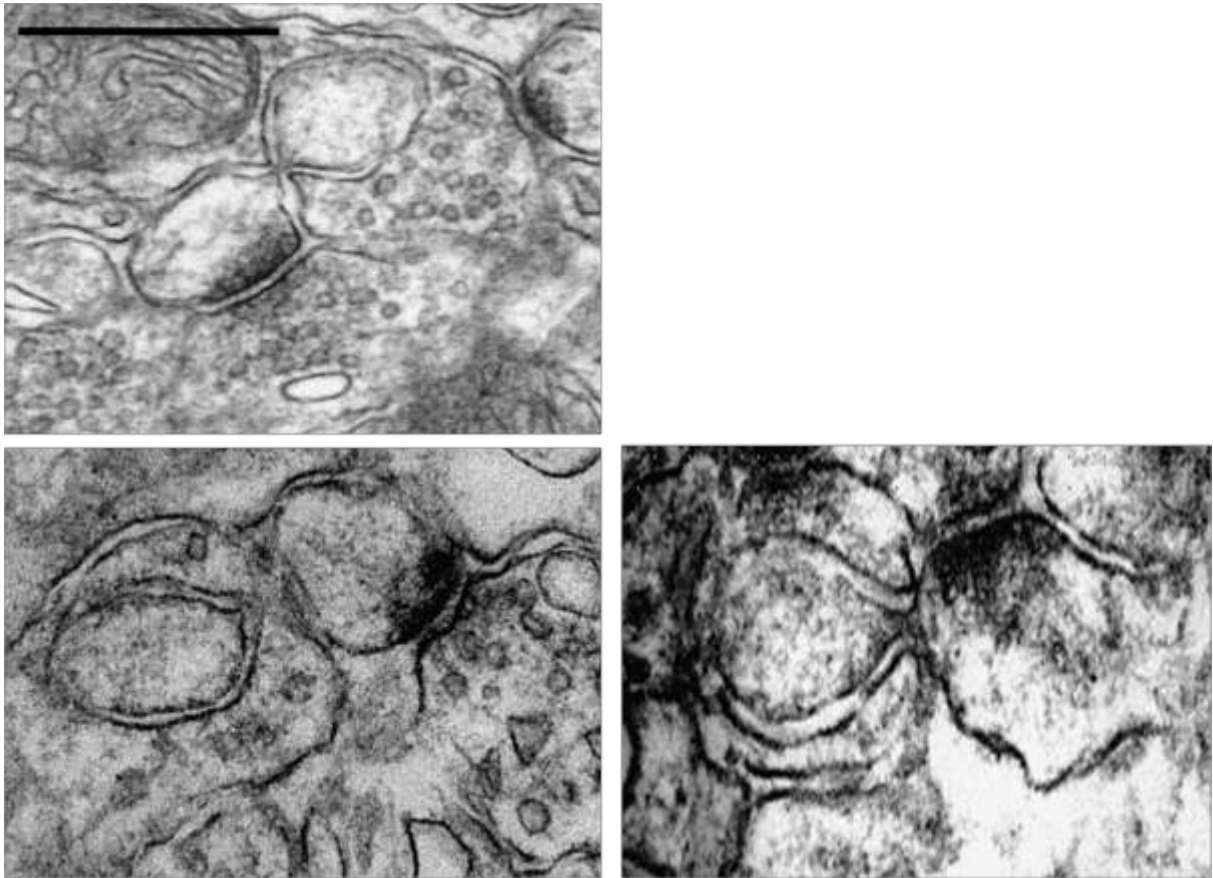
3. Une nouvelle utilité possible du fasudil

Nous avons montré dans notre étude que l'A β o induit une phosphorylation de la cofiline1 et une stabilisation de l'actine synaptique. Ces mêmes effets peuvent être en partie rétablis par un traitement à l'inhibiteur de Rho-kinase : le fasudil. L'implication de Rock1/2 et les effets thérapeutiques du fasudil ont été montrés dans de nombreuses pathologies du système vasculaire et cardiovasculaire comme l'hypertension ou l'athérosclérose (Shi & Wei, 2013). Le fasudil s'avère également efficace dans le traitement de maladies du système nerveux central comme les traumatismes de la moelle épinière, les accidents vasculaires cérébraux, mais aussi la MA (Kubo et al., 2008). En effet, dans la région CA1 de souris APP/PS-1, une diminution de la longueur et des branchements dendritiques imputable à une hyperactivité de RockII a été montrée. Le phénotype peut-être restauré par administration de fasudil chez l'animal, à raison de 0,6mg/kg/jour pendant 24-26 jours (Couch et al., 2010).

Par ailleurs RockII est impliquée dans le processing amyloïdogénique de l'APP par phosphorylation de ce dernier en thréonine 654 et l'inhibition pharmacologique de RockII par le composé SR3677 est neuroprotectrice (Herskowitz et al., 2013). Notre étude s'inscrit dans cette lignée et pourrait présenter une possible nouvelle implication de RockII dans la MA et plus spécifiquement dans la synaptotoxicité A β o-dépendante. Le fasudil pourrait de ce fait représenter un candidat potentiel dans la préservation et la consolidation synaptique, susceptible de diminuer/retarder les déficits mnésiques rencontrés dans les stades précoces de la MA.

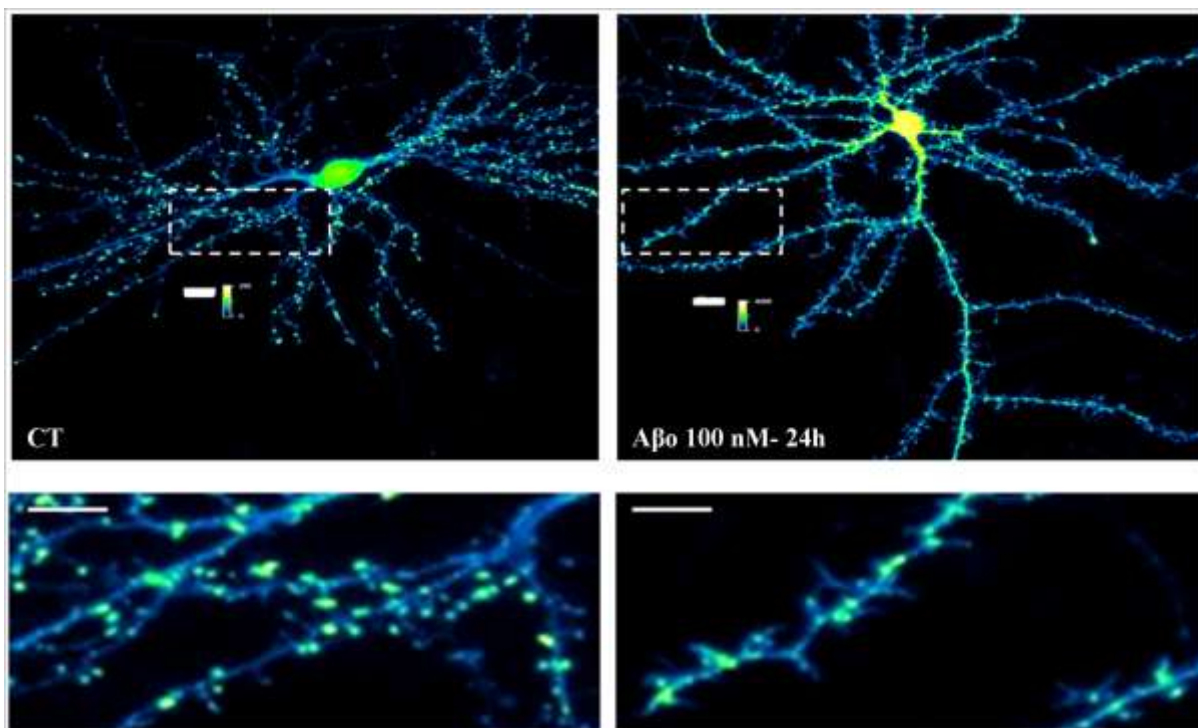
En conclusion, l'ensemble de ces travaux démontre l'existence d'épines dendritiques altérées dans leur morphologie, par une phosphorylation de la cofiline1 A β o-dépendante conduisant à une stabilisation et un allongement progressif des filaments d'actine. De telles altérations dans la forme des épines pourraient constituer un état précurseur de la perte synaptique. Les mécanismes médiateurs de l'atteinte d'A β o sur le cytosquelette restent encore à élucider, mais offrent de nouvelles perspectives quant à l'altération de la neurotransmission et l'effondrement synaptique induit par A β o.

Annexes



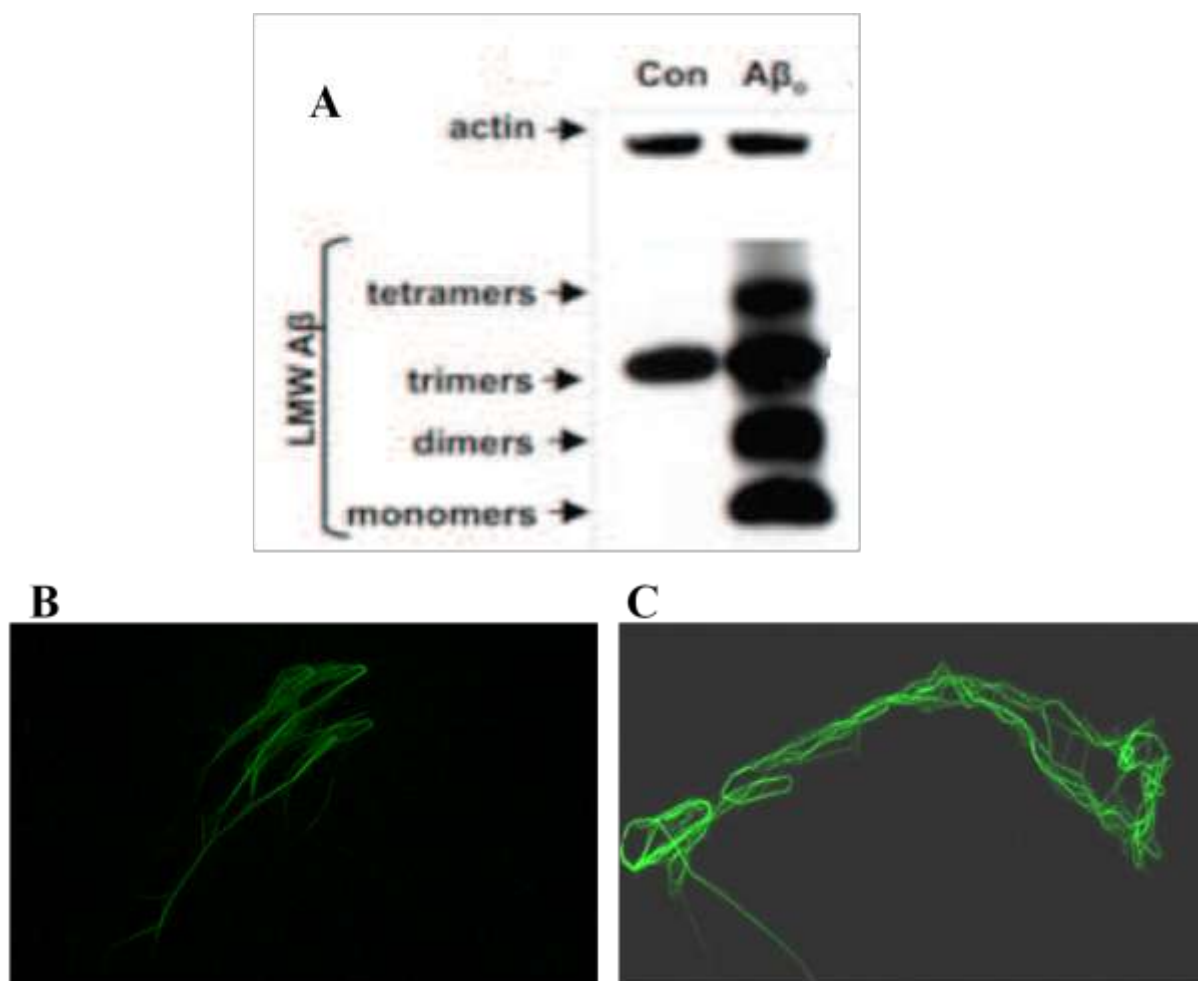
Annexe 1 : Cas particuliers de protrusions géantes chez la souris APP/PS-1.

Electronographies de synapses avec spinule à diamètre comparable à celui de l'épine. La spinule s'insère dans le bouton pré-synaptique (haut) ou ce qui semble être un bouton axonal voisin (bas). Barre d'échelle : 500 nm.



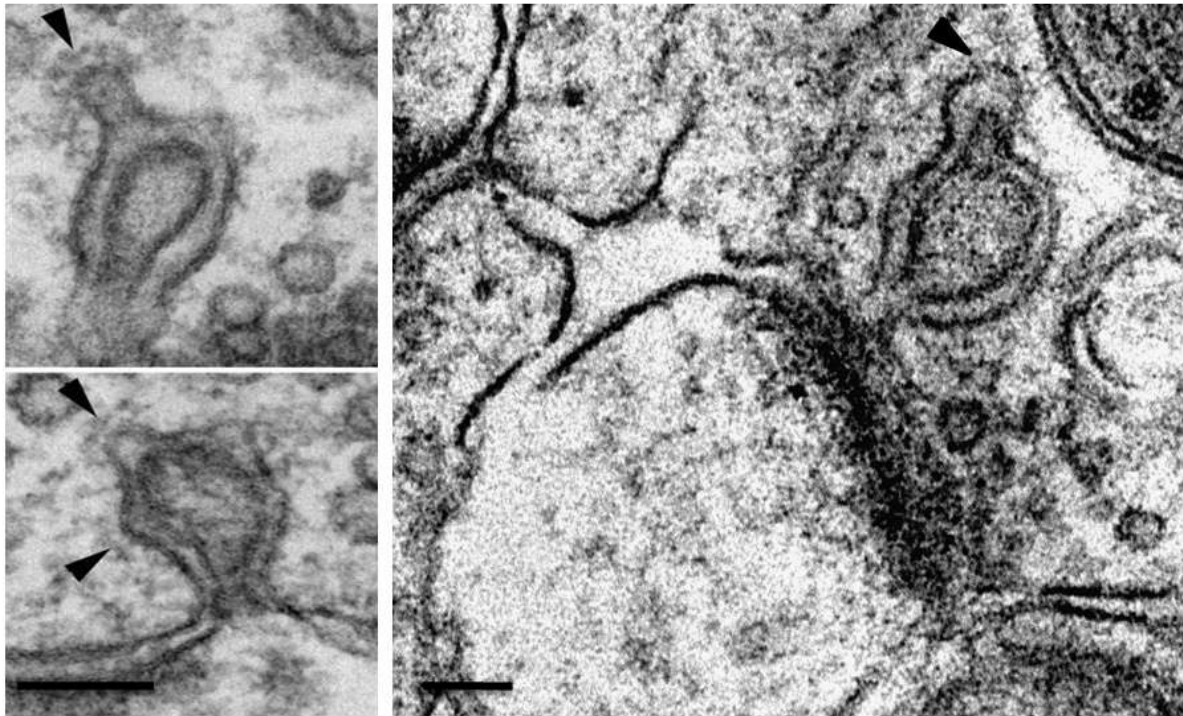
Annexe 2 : L'exposition d'Aβo pendant 24 h induit une augmentation du nombre de filopodes.

Neurones corticaux (14 DIV) transfectés au Lifeact-eGFP et imagés avant (CT) et après 24 h de traitement à l'Aβo (100 nM- 24 h). Notez la présence d'épines bulbeuses enrichies en actine devenant filopodes après traitement, donnant au neurone un aspect hérissé. Barre d'échelle : 10 μm.



Annexe 3 : L'Aβ se retrouve associé à l'actine.

A, Western-Blot représentatif anti-actine et anti-Aβ (4G8) de lysat de neurones corticaux en culture (14 DIV) traités à l'Aβ (1 μM- 15 min) et suivis de 5 cycles de lavage et d'immunoprécipitation d'actine-F par le complexe moléculaire Dynabeads®-streptavidine- biotine-phalloïdine. B, image représentative de macrostructures actine-Aβ obtenues par marquage de l'actine-F par de la phalloïdine-FITC d'un mélange in vitro d'actine polymérisée et d'Aβ. Lorsque le milieu est dilué au 1/10ème pour induire la dépolymérisation des filaments, les structures actine-Aβ persistent (C).



Annexe 4 : Les spinules pourraient être impliqués dans un processus pré-synaptique de recyclage en masse.

Electronographies montrant le bourgeonnement de vésicules (pointes de flèche) à partir de la membrane externe/pré-synaptique de spinules inclus dans le bouton axonal. Barre d'échelle : 100 nm. Adapté de Tao-Cheng et al., 2009.

Références

<http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/d%C3%A9mence/23271>

[http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-
psychiatrie/dossiers-d-information/alzheimer](http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/alzheimer)

<http://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>

<http://trauma.blog.yorku.ca/2013/02/santiago-ramon-y-cajals-neuron/>

A

Ackermann, M. & Matus, A., 2003. Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nature neuroscience*, 6(11), pp.1194–1200.

Akin, O. & Mullins, R.D., 2008. Capping Protein Increases the Rate of Actin-Based Motility by Promoting Filament Nucleation by the Arp2/3 Complex. *Cell*, 133(5), pp.841–851.

Allsop, D. et al., 1983. The isolation and amino acid composition of senile plaque core protein. *Brain Research*, 259(2), pp.348–352.

Alonso-Nanclares, L. et al., 2013. Synaptic changes in the dentate gyrus of APP/PS1 transgenic mice revealed by electron microscopy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 72(5), pp.386–395.

Alzheimer A., 1907. Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. *Neurologisches Centralblatt*; 23: 1129–36.

Andrianantoandro, E. & Pollard, T.D., 2006. Mechanism of Actin Filament Turnover by Severing and Nucleation at Different Concentrations of ADF/Cofilin. *Molecular Cell*, 24(1), pp.13–23.

Anggono, V. & Huganir, R.L., 2012. Regulation of AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*. 22(3), pp.461–469

Araya, R. et al., 2006. Dendritic spines linearize the summation of excitatory potentials. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(49), pp.18799–18804.

Auer, M. et al., 2011. Rho GTPases as regulators of morphological neuroplasticity. *Annals of Anatomy*, 193(4), pp.259–266.

B

- Balietti M. et al., 2013. Early selective vulnerability of synapses and synaptic mitochondria in the hippocampal CA1 region of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 34, 887-896.
- Barnham, K.J. et al., 2003. Neurotoxic, Redox-competent Alzheimer's β -Amyloid Is Released from Lipid Membrane by Methionine Oxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(44), pp.42959–42965.
- Barone, E. et al., 2014. Inactivation of brain cofilin-1 by age Alzheimer's disease and γ -sécrétase. *Biochimica et Biophysica acta*, 1842, 2500-2509.
- Berezovska, O. et al., 2005. Familial Alzheimer's Disease Presenilin 1 Mutations Cause Alterations in the Conformation of Presenilin and Interactions with Amyloid Precursor Protein. *The Journal of Neuroscience*, 25(11), pp.3009–3017.
- Bernstein, B.W. et al., 2000. Intracellular pH modulation of ADF/cofilin proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 47(4), pp.319–336.
- Bernstein, B.W. & Bamburg, J.R., 2010. ADF/Cofilin: A functional node in cell biology. *Trends in Cell Biology*, 20(4), pp.187–195.
- Birnbaum, J.H. et al., 2015. Calcium flux-independent NMDA receptor activity is required for A β oligomer-induced synaptic loss. *Cell Death and Disease*, 6(6), p.e1791.
- Blanchoin, L. & Pollard, T.D., 1999. PROTEIN CHEMISTRY AND STRUCTURE : Mechanism of Interaction of Acanthamoeba Mechanism of Interaction of Acanthamoeba Actophorin (ADF / Cofilin) with Actin Filaments. *J. Biol. Chem.*, 274(22), pp.15538–15546.
- Bliss, T. V & Lomo. T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*, 232(2), pp.357–374.
- Block, J. et al., 2008. Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3. *Journal of Microscopy*, 231(3), pp.506–517.
- Bloodgood, B.L. & Sabatini, B.L., 2005. Neuronal activity regulates diffusion across the neck of dendritic spines. *Science*, 310(5749), pp.866–869.
- Bordji, K. et al., 2010. Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid- β production. *The Journal of neuroscience*, 30(47), pp.15927–15942.

Bourne, J. & Harris, K.M., 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), pp.381–386.

Boyl & Witke, 2014. Small, smaller... dendritic spine. *The EMBO journal*, 33(23), pp.2737–2739.

Bozhilova-Pastirova A. & Ovtcharoff W., 1999. Intramembranous structures of synaptic membranes with special reference to psinules in the rat sensorimotor cortex. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 11, pp. 1843-1846.

Braak, H. & Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica*, 82(4), pp.239–259.

Bredt, D. & Nicholl, R. A, 2003. AMPA Receptor Trafficking at Excitatory Synapses. *Neuron*, 40(2), pp.361–379.

Bu, G. et al., 2006. LRP in amyloid- β production and metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1086, pp.35–53.

C

Carlier M.F & Pantaloni D, 1986. Direct evidence for ADP-Pi-F-actin as the major intermediate in ATP-actin polymerisation. Rate of dissociation of Pi from actin filaments. *Biochemistry*. Dec 2;25(24):7789-92.

Carlin, R.K. et al., 1980. Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *Journal of Cell Biology*, 86(3), pp.831–843.

Carlin, R.K. & Siekevitz, P., 1983. Plasticity in the central nervous system: do synapses divide? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(11), pp.3517–3521.

Chang K. T. et al., 2013. Meeting at the crossroads: common mechanisms in Fragile X and Down syndrome. *Trends in Neuroscience*, 36(12): 685–694

Chapleau C. A. et al., 2009. Modulation of dendritic spine development and plasticity by BDNF and vesicular trafficking: fundamental roles in neurodevelopmental disorders associated with mental retardation and autism. *J Neurodevelop Disord*. 1: 185-196.

Chen, L.Y. et al., 2007. Changes in Synaptic Morphology Accompany Actin Signaling during LTP. *The Journal of Neuroscience*, 27(20), pp.5363–5372.

Cheng, L. et al., 2009. Amyloid β -protein fragments 25-35 and 31-35 potentiate long-term depression in hippocampal CA1 region of rats in vivo. *Synapse*, 63(3), pp.206–214.

Chin-Chan, M. et al., 2015. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, pp.1–22.

Cingolani, L.A. & Goda, Y., 2008. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature Reviews. Neuroscience*, 9(5), pp.344–356.

Corder, E.H. et al., 1994. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature genetics*, 7(2), pp.180–184.

Couch, B. a et al., 2010. Increased dendrite branching in AbetaPP/PS1 mice and elongation of dendrite arbors by fasudil administration. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 20(4), pp.1003–8.

Cox S., 2015. Super-resolution imaging in live cells. *Developmental Biology*. 2015 May 1; 401(1): 175–181.

Crimins J. L., et al., 2013. The intersection of amyloid beta and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease. *Ageing Research Review*. 12(3): 757–763

D

Dailey, M.E. & Smith, S.J., 1996. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *The Journal of neuroscience*. 16(9), pp.2983–2994.

Davis, S. et al., 2000. The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *The Journal of neuroscience*, 20(12), pp.4563–4572.

Davies S. P. et al., 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochemical. Journal*. (2000) 351, 95–105

De Curtis I., 2008. Functions of Rac GTPases during Neuronal Development. *Developmental. Neuroscience*. ; 30 : 47-58.

De Juan J. & Garcia M., 1998. Interocular effect of actin depolymerization on spinule formation in teleost retina. *Brain Research*. 792, Issue 1, 4 May, Pages 173–177.

Delacourte A & Défossez A. 1986. Biochemical characterization of an immune serum which specifically marks neurons in neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 303(11):439-44.

De La Cruz E. M. et al., 2000. Polymerization and structure of nucleotide-free actin filaments. *Journal of Molecular Biology*, Jan 21;295(3):517-26.

De La Cruz, E.M. & Gardel, M.L., 2015. Actin mechanics and fragmentation. *Journal of Biological Chemistry*, 290(28).

Derkach, V. et al., 1999. Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), pp.3269–3274.

Deutsch K, and Hillman H. 1977. The effect of six fixatives on the areas of rabbit neurons and rabbit and rat cerebral slices. *Journal of Microscopy*. Apr;109(3):303-9.

Dobrowolska, J. A. et al., 2014. CNS Amyloid- β , Soluble APP- α and - β Kinetics during BACE Inhibition. *The Journal of neuroscience*. 34(24), pp.8336–46.

Dolan, P.J. & Johnson, G.V.W., 2010. The role of tau kinases in Alzheimer's disease. *Current opinion in drug discovery & development*, 13(5), pp.595–603.

E

Edwards, D.C. et al., 1999. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nature cell biology*, 1(5), pp.253–259.

El Gaamouch, F. et al., 2012. Interaction Between CaMKII and GluN2B Controls ERK-Dependent Plasticity. *The Journal of Neuroscience*, 32(31), pp.10767–10779.

F

Fedorov A. A. et al., 1997. Structure determination of yeast cofilin. *Nature Structural & Molecular Biology*. 4(5):366-9.

Ferreira, I.L. et al., 2015. A β and NMDAR activation cause mitochondrial dysfunction involving ER calcium release. *Neurobiology of aging*, 36(2), pp.680–92.

Fiala, J.C. et al., 1998. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *The Journal of neuroscience*. 18(21), pp.8900–8911.

Fiala J. C. et al.,. 2002. Dendritic spines do not split during hippocampal LTP or maturation. *Nature Neuroscience* 5, 297 - 298.

Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D. & Matus, A., 1998. Rapid actin based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20, 847–854

Foletta, V.C. et al., 2004. LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Experimental Cell Research*, 294(2), pp.392–405.

Frandemiche M.L. et al., 2014. Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers. *The Journal of Neuroscience*, Apr 23;34(17):6084-97

Frantz, C. et al., 2008. Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding. *Journal of Cell Biology*, 183(5), pp.865–879.

Fuentealba, R. a. et al., 2010. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates neuronal A β 42 uptake and lysosomal trafficking. *PLoS ONE*, 5(7), pp.1–10.

Fukazawa, Y. et al., 2003. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron*, 38(3), pp.447–460.

G

Geinisman, Y. et al., 2001. Associative learning elicits the formation of multiple-synapse boutons. *The Journal of neuroscience*, 21(15), pp.5568–5573.

Gengler S. et al., 2010. Synaptic plasticity in the hippocampus of a APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease is impaired in old but not young mice. *PloS one*, 5(3), p.e 9764.

Glenner, G.G. & Wong, C.W., 1984. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 122(3), pp.1131–1135.

Glenner, G.G. & Wong, C.W., 1984. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120(3), pp.885–890.

Goedert, M. et al., 1988. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(11), pp.4051–4055.

Görlich, A. et al., 2011. N-cofilin can compensate for the loss of ADF in excitatory synapses. *PLoS ONE*, 6(10).

Götz, J. et al., 2008. An update on the toxicity of Abeta in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 4(6), pp.1033–42.

Graceffa, P. & Dominguez, R., 2003. Crystal structure of monomeric actin in the ATP state: Structural basis of nucleotide-dependent actin dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), pp.34172–34180.

Greenough W. T., West R. W. and DeVoogd T. J., 1978. Subsynaptic perforation: changes with age and experience in the rat. *Science*. Dec 8;202(4372):1096-8

Grundke-Iqbal, I. et al., 1989. Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(8), pp.2853–2857.

Guillery, R.W., 2000. Early electron microscopic observations of synaptic structures in the cerebral cortex: A view of the contributions made by George Gray (1924-1999). *Trends in Neurosciences*, 23(12), pp.594–598.

Guo, M.L. et al., 2012. Interactions and phosphorylation of postsynaptic density 93 (PSD-93) by extracellular signal-regulated kinase (ERK). *Brain Research*, 1465, pp.18–25.

Gurniak, C.B., Perlas, E. & Witke, W., 2005. The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. *Developmental Biology*, 278(1), pp.231–241.

Gu J. et al., 2010. ADF/Cofilin-Mediated Actin Dynamics Regulate AMPA Receptor Trafficking during Synaptic Plasticity. *Nature Neuroscience*, 13(10):1208-15.

H

Haass, C. & Selkoe, D.J., 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(2), pp.101–112.

Haas, M. a et al., 2013. Alterations to dendritic spine morphology, but not dendrite patterning, of cortical projection neurons in Tc1 and Ts1Rhr mouse models of Down syndrome. *PloS one*, 8(10), p.e78561.

Hardy, J. et al., 1998. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nature neuroscience*, 1(5), pp.355–358.

Hardy, J. A & Higgins, G. A, 1992. Alzheimer ' s Disease : The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*. Apr 10;256(5054):184-5.

Hardy, J. & Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), pp.353–356

Harris K. M. 2008 Diversity in Synapse structure and composition. *Springer Science+Business Media*.

Harris, K.M. et al. 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *The Journal of neuroscience*. 12(7), pp.2685–2705

Harris K. M. , and Kater S. B.. 1994. Dendritic Spines: Cellular Specializations Imparting Both Stability and Flexibility to Synaptic Function. *Annual Review of Neuroscience* Vol. 17: 341-371

Harris, K.M. & Stevens, J.K., 1988. Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *The Journal of neuroscience*. 8(12), pp.4455–4469.

Hatton, J.D. & Ellisman, M.H., 1982. A restructuring off hypothalamic synapses is associated with motherhood. *The Journal of neuroscience*. 2(6), pp.704–707.

Hayashi Y. et al., 2000. Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science*. Mar 24;287(5461):2262-7.

Heredia, L. et al., 2006. Phosphorylation of actin-depolymerizing factor/cofilin by LIM-kinase mediates amyloid beta-induced degeneration: a potential mechanism of neuronal dystrophy in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience*. 26(24), pp.6533–42.

Hering H & Sheng M. 2001. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Review Neuroscience*. Dec;2(12):880-8.

Herskowitz, J.H. et al., 2013. Pharmacologic Inhibition of ROCK2 Suppresses Amyloid- β Production in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Journal of Neuroscience*, 33(49), pp.19086–19098.

Holler C. J. et al., 2014. Bridging Integrator 1 (BIN1) Protein Expression Increases in the Alzheimer's Disease Brain and Correlates with Neurofibrillary Tangle Pathology. *Journal of Alzheimers Disease*. January 1; 42(4)

Hotulainen, P. et al., 2005. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Molecular biology of the cell*, 16(2), pp.649–664.

Hotulainen, P. et al., 2009. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *The Journal of cell biology*, 185(2), pp.323–39.

Hotulainen, P. & Hoogenraad, C.C., 2010. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal of cell biology*, 189(4), pp.619–29.

Hsieh, H. et al., 2006. AMPAR Removal Underlies A β -Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss. *Neuron*, 52(5), pp.831–843.

Huang, T.Y. et al., 2006. Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(1), pp.26–31.

Hughes, S.R. et al., 1996. Two-hybrid system as a model to study the interaction of beta-amyloid peptide monomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(5), pp.2065–70.

I

Ihara, Y. et al., 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Journal of biochemistry*, 99(6), pp.1807–1810.

Irwin S. A. et al., 2000. Dendritic Spine Structural Anomalies in Fragile-X Mental Retardation syndrome. *Cereb Cortex*. 2000 Oct;10(10):1038-44.

J

Jankowsky J. L. et al., 2003. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific γ sécrétase. *Human Molecular Genetics*, 13(2), pp.159–170

Jonsson, T. et al., 2012. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, 488(7409), pp.96–99

K

Kang, J. & Müller-Hill, B., 1990. Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochemical and biophysical research communications*, 166(3), pp.1192–1200.

Kelleher III R. J. et al., 2004. Translational Regulatory Mechanisms Review in Persistent Forms of Synaptic Plasticity. *Neuron*, Vol. 44, 59–73, September 30

Kero, M. et al., 2013. Amyloid precursor protein (APP) A673T mutation in the elderly Finnish population. *Neurobiology of Aging*, 34(5), pp.1518.e1–1518.e3.

Kervern M. et al., 2012. Selective impairment of some forms of synaptic plasticity by Oligomeric Amyloid- β peptide in the mouse hippocampus: Implications of Extrasynaptic NMDA receptors. *Journal of Alzheimer's disease*. 32: 183-196.

Kessels H. W. and Roberto Malinow R., 2009. Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. *Neuron*. February 12; 61(3): 340–350.

KIDD M. 1963. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature*. Jan 12; 197: 192-3.

Kim, S.J. et al., 2013. Two β -strands of RAGE participate in the recognition and transport of amyloid- β peptide across the blood brain barrier. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439(2), pp.252–257.

Kim E, & Sheng M. 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci*. Oct;5(10):771-81.

Kiraly D. D. et al., 2010. Synaptic Plasticity, a symphony in GEF. *ACS Chem. Neurosci.*,1, 348-365.

Kitaoka, Y. et al., 2004. Involvement of RhoA and possible neuroprotective effect of fasudil, a Rho kinase inhibitor, in NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *Brain Research*, 1018(1), pp.111–118.

Knobloch M. & Mansuy I. M., 2008. Dendritic spine loss and Synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 37: 73-82.

Kogata N. et al., 2009. Integrin-Linked kinase controls vascular wall formation by negatively regulating Rho/ROCK-mediated vascular smooth muscle cell contraction. *Gene Development*. 23: 2278-2283.

Korobova F. and Svitkina T., 2010, Molecular Architecture of Synaptic Actin Cytoskeleton in Hippocampal Neurons Reveals a Mechanism of Dendritic Spine Morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 21, 165–176, January 1, 2010.

Kosik, K.S et al., 1986. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(11), pp.4044–4048.

Kostylev, M. a. et al., 2015. Prion-Protein-interacting Amyloid- β Oligomers of High Molecular Weight Are Tightly Correlated with Memory Impairment in Multiple Alzheimer Mouse Models. *Journal of Biological Chemistry*, 290(28), pp.17415–17438.

Koth, A.P. et al., 2014. Participation of group I p21-activated kinases in neuroplasticity. *Journal of Physiology-Paris*, 108, pp.270–277.

Kubo, T. et al., 2008. The therapeutic effects of Rho-ROCK inhibitors on CNS disorders. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(3), pp.605–615.

Kurita S. et al., 2007. Actin filaments-stabilizing and -bundling activities of cofilin-phosphatase Slingshot-1. *Genes Cells*; 12 (5): 663-676.

Kurita, S. et al., 2008. Molecular dissection of the mechanisms of substrate recognition and F-actin-mediated activation of cofilin-phosphatase slingshot-1. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), pp.32542–32552.

L

Lacor, P.N. et al., 2004. Synaptic Targeting by Alzheimer's-Related Amyloid Oligomers. *The Journal of Neuroscience*, 24(45), pp.10191–10200.

Lacor, P.N. et al., 2007. A β Oligomer-Induced Aberrations in Synapse Composition, Shape, and Density Provide a Molecular Basis for Loss of Connectivity in Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 27(4), pp.796–807.

LaFerla, F.M., Green, K.N. & Oddo, S., 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(7), pp.499–509.

Lambert, M.P. et al., 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), pp.6448–6453.

Landis, D.M.D. & Reese, T.S., 1983. Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *Journal of Cell Biology*, 97(4), pp.1169–1178.

Lesné S. et al. 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*. Mar 16;440(7082):352-7.

Lemtiri-Chlieh, F. et al., 2011. Kalirin-7 is necessary for normal NMDA receptor-dependent synaptic plasticity. *BMC Neuroscience*, 12(1), p.126.

Li, S. et al., 2011. Soluble A Oligomers Inhibit Long-Term Potentiation through a Mechanism Involving Excessive Activation of Extrasynaptic NR2B-Containing NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 31(18), pp.6627–6638.

Li Z. and Sheng M., 2003. Some assembly required: the development of neuronal synapses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 833-841

Lin, Y.-C. & Redmond, L., 2008. CaMKII β binding to stable F-actin in vivo regulates F-actin filament stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(41), pp.15791–15796.

Lisman J. et al., 2012 Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews Neuroscience* 13, 169-182

Liu, F. et al., 2005. Truncation and Activation of Calcineurin A by Calpain I in Alzheimer Disease Brain. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), pp.37755–37762.

Luczynski, P. et al., 2015. Chronic stress alters the dendritic morphology of callosal neurons and the acute glutamate stress response in the rat medial prefrontal cortex. *Stress*, Nov;18(6):654-67.

Lynch G et al., 1983. Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature*. Oct 20-26;305(5936):719-21.

Luo L., 2002. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.* 18:601-35.

M

Ma Q. L. et al., 2012. PAK in Alzheimer disease, Huntington disease and X-linked mental retardation. *Cellular Logistics* 2:2, 117-125.

Malinow R. et al, 1988. Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. *Nature* 335, 820-824 27 October

Marston D. J. et al., 2003. Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph–ephrin contact repulsion. *Nature Cell Biology* 5, 879 - 888.

Matter, M.L. et al., 1998. The $\alpha 5 \beta 1$ integrin mediates elimination of amyloid- β peptide and protects against apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 141(4), pp.1019–1030.

Maurer K. et al., 1997. Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet*, May 24;349(9064):1546-1549.

McCullough, B.R. et al., 2011. Cofilin-linked changes in actin filament flexibility promote severing. *Biophysical Journal*, 101(1), pp.151–159.

Menéndez-González, M. et al., 2006. APP processing and the APP-KPI domain involvement in the amyloid cascade. *Neurodegenerative Diseases*, 2(6), pp.277–283.

Meng Y., et al., 2002. Abnormal Spine Morphology and Enhanced LTP in LIMK-1 Knockout Mice. *Neuron*, Vol 35, 121-133.

Michaelson, D.M., 2014. APOE $\epsilon 4$: The most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 10, pp.861–868.

Miller C.C. et al., 1986. Alzheimer's paired helical filaments share epitopes with neurofilament side arms. *The EMBO Journal*. Feb;5(2):269-76.

Miller M & Peters A. 1981. Maturation of rat visual cortex. II. A combined Golgi-electron microscope study of pyramidal neurons. *Journal of Comparative Neurology*. Dec 20;203(4):555-73.

Michel, K. et al., 2015. The presynaptic active zone: A dynamic scaffold that regulates synaptic efficacy. *Experimental Cell Research*, 335(2), pp.157–164

Mizuno, K., 2013. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cellular Signalling*, 25(2), pp.457–469.

Moehlmann, T. et al., 2002. Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), pp.8025–8030.

Mori H. et al., 1987 Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science*; 235(4796):1641-4.

Morishita, W. et al., 2001. Regulation of synaptic strength by protein phosphatase 1. *Neuron*, 32(6), pp.1133–1148.

Morris R. G. M. et al., 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319, 774 – 776

Muly, E.C. et al., 2008. Subcellular distribution of the Rho-GEF Lfc in primate prefrontal cortex: Effect of neuronal activation. *The Journal of Comparative Neurology*, 508(6), pp.927–939.

Murakoshi et al., 2011. Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature*, 472(7341): 100-104.

Murphy M. P. et al., 2007. A β solubility and deposition during AD progression and in APP X PS-1 knock-in mice. *Neurobiology of disease*, 27: 301-311.

N

Nagata-Ohashi, K. et al., 2004. A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia. *The Journal of Cell Biology*, 165(4), pp.465–471.

Narita, A., Oda, T. & Maéda, Y., 2011. Structural basis for the slow dynamics of the actin filament pointed end. *The EMBO journal*, 30(7), pp.1230–1237.

Nilsberth, C. et al., 2001. The “Arctic” APP mutation (E693G) causes Alzheimer’s disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nature neuroscience*, 4(9), pp.887–893.

Nukina, N. & Ihara, Y., 1986. One of the antigenic determinants of paired helical filaments is related to tau protein. *Journal of biochemistry*, 99(5), pp.1541–1544.

O

Ohashi, K. et al., 2000. Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *The Journal of biological chemistry*, 275(5), pp.3577–82.

Okamoto, K.-I. et al., 2004. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nature neuroscience*, 7(10), pp.1104–1112.

Okamoto, K.-I. et al., 2007. The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(15), pp.6418–6423.

Opazo P., Sainlos M. & Choquer D., 2012. Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. *Current Opinion in Neurobiology* Volume 22, Issue 3, June, Pages 453–460

Oser, M. et al., 2009. Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. *Journal of Cell Biology*, 186(4), pp.571–587.

P

Park, M. et al., 2004. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5692), pp.1972–1975.

Patterson, M. et al., 2010. AMPA receptors are exocytosed in stimulated spines and adjacent dendrites in a Ras-ERK-dependent manner during long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(36), pp.15951–15956.

Penzes, P. et al., 2001. The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron*, 29(1), pp.229–242.

Penzes P. et al., 2011. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci.* 14,3: 285-293

Penzes, P. & Vanleeuwen, J.-E., 2011. Impaired regulation of synaptic actin cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Brain research reviews*, 67(1-2), pp.184–92.

Perea G. et al., 2009 Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neuroscience*, Aug;32(8):421-31

Peters A, Kaiserman-Abramof IR. 1970. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *American Journal of Anatomy*. 1970 Apr;127(4):321-55.

Pollard, T. D., 1986. Rate constants for the reactions of ATP-and ADP-actin with the ends of actin filaments. *Journal of Cell Biology*, 103(6), p.2747.

Pollard, T.D. & Borisy, G.G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4), pp.453–465.

Purves et al., 2004. Neuroscience third edition. *Sunderland*.

Prudent, R. et al., 2012. Pharmacological inhibition of LIM kinase stabilizes microtubules and inhibits neoplastic growth. *Cancer Research*, 72(17), pp.4429–4439.

Q

R

Radde, R. et al., 2006. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO reports*, 7 (9). pp 940-946

Rajendran, L. et al., 2006. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), pp.11172–11177.

Ralph A. Nixon. 2007. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *Journal of Cell Science*, 120, 4081-4091

Raymond, C.R et al., 2003. NMDA receptor regulation by amyloid- β does not account for its inhibition of LTP in rat hippocampus. *Brain Research*, 968(2), pp.263–272

Rex, C.S. et al., 2009. Different Rho GTPase-dependent signaling pathways initiate sequential steps in the consolidation of long-term potentiation. *The Journal of cell biology*, 186(1), pp.85–97.

Richards, D. A. et al., 2005. Glutamate induces the rapid formation of spine head protrusions in hippocampal slice cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(17), pp.6166–6171.

Roberson, E.D. & Sweatt, J.D., 1996. Transient activation of cyclic AMP-dependent protein kinase during hippocampal long-term potentiation. *The Journal of biological chemistry*, 271(48), pp.30436–30441.

Robinson, R.C. et al., 2001. Crystal Structure of Arp2 / 3 Complex. *Science*, 294(November), pp.1679–1685.

Rocca D. L. et al., 2013 The Small GTPase Arf1 Modulates Arp2/3-Mediated Actin Polymerization via PICK1 to Regulate Synaptic Plasticity. *Neuron*. 79: 293-307.

Rushworth, J. V. et al., 2013. Prion protein-mediated toxicity of amyloid- β oligomers requires lipid rafts and the transmembrane LRP1. *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), pp.8935–8951.

Rust, M.B. et al., 2010. Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *The EMBO journal*, 29(11), pp.1889–902

S

Salminen, A. et al., 2008. ROCK, PAK, and Toll of synapses in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371(4), pp.587–590.

Sekino, Y. et al., 2007. Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochemistry International*, 51(2-4 SPEC. ISS.), pp.92–104.

Sept, D. et al., 1999. Computer simulations of actin polymerization can explain the barbed-pointed end asymmetry. *Journal of Molecular. Biology*, 294(5):1181-9.

Serneels, L. et al., 2009. gamma-Sécrétase heterogeneity in the Aph1 subunit: relevance for Alzheimer's disease. *Science.* , 324(May), pp.639–643

Serrano-Pozo A. et al., 2015. APOE ϵ 2 is associated with milder clinical and pathological Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, June; 77(6): 917–929

Shahani N and Brandt R. 2002. Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cellular & Molecular Life Sciences*. Oct;59(10):1668-80.

Shankar, G.M. et al., 2007. Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. *The Journal of Neuroscience*, 27(11), pp.2866–2875.

Shankar, G.M. et al., 2008. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature medicine*, 14(8), pp.837–842.

Sheng, M. & Hoogenraad, C.C., 2007. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annual review of biochemistry*, 76, pp.823–847.

Shi J. and Wei L., 2013. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology: the effect of fasudil. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 62(4).

Shirotani M. et al., 1991. A New Type of Vasodilator, HAl 077, an Isoquinoline Derivative , Inhibits Proliferation of Bovine Vascular Smooth Muscle Cells in lesion. *The journal of pharmacology and cell therapeutics*. pp.738–744.

Šišková, Z. et al., 2014. Dendritic Structural Degeneration Is Functionally Linked to Cellular Hyperexcitability in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuron*, 84(5), pp.1023–1033.

Snyder, S.W. et al., 1994. Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths. *Biophysical journal*, 67(3), pp.1216–1228.

Snyder, E.M. et al., 2005. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nature neuroscience*, 8(8), pp.1051–1058.

Sorra K. E. et al., 1998. Critical assessment of the involvement of perforations, spinules, and spine branching in hippocampal synapse formation. *J Comp Neurol*. Aug 24;398(2):225-40

Sorra, K.E. & Harris, K.M., 2000. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*, 10(5), pp.501–511.

Sotelo, C., 1990. Cerebellar synaptogenesis: what can we learn from mutant mice. *Journal of Experimental. Biology*. 153, 225-249.

Spacek, J. & Harris, K.M., 1997. Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(1), pp.190–203.

Spacek, J. & Harris, K.M., 2004. Trans-endocytosis via spinules in adult rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(17), pp.4233–4241.

Star, E.N., Kwiatkowski, D.J. & Murthy, V.N., 2002. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nature neuroscience*, 5(3), pp.239–246.

Steiner, H. et al., 2001. A pathogenic presenilin-1 deletion causes aberrant A β 42 production in the absence of congophilic amyloid plaques. *The Journal of biological chemistry*, 276(10), pp.7233–9.

Suarez, C. et al., 2011. Cofilin tunes the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries. *Current Biology*, 21(10), pp.862–868.

T

Tai M. L. et al., 2014. Levels of Soluble Apolipoprotein E/Amyloid- β (A β) Complex Are Reduced and Oligomeric A β Increased with *APOE4* and Alzheimer Disease in a Transgenic Mouse Model and Human Samples. *J Biol Chem* Feb 22; 288(8): 5914–5926.

Talantova, M. et al., 2013. A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(27), pp.E2518–E2527.

Tao-Cheng, J.H. et al., 2009. Rapid turnover of spinules at synaptic terminals. *Neuroscience*, 160(1), pp.42–50.

Tolias K. F. et al., 2011. Control of synapse development and plasticity by Rho GTPase regulatory proteins. *Progress in Neurobiology*. July; 94(2): 133-148.

Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Bron CR, Muller D (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402:421–425

Tsay D. and Yuste R. 2004. On the electrical function of dendritic Spines. *TRENDS in Neurosciences* Vol.27 No.2 February

Tu, S. et al., 2014. Oligomeric A β -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 9(48), pp.1–12.

U

Ueda, Y. & Hayashi, Y., 2013. PIP3 Regulates Spinule Formation in Dendritic Spines during Structural Long-Term Potentiation. *Journal of Neuroscience*, 33(27), pp.11040–11047.

Ulrich, D., 2015. Amyloid- β Impairs Synaptic Inhibition via GABA_A Receptor Endocytosis. *Journal of Neuroscience*, 35(24), pp.9205–9210.

Um, J.W. et al., 2013. Alzheimer Amyloid- β Oligomer Bound to Post-Synaptic Prion Protein Activates Fyn to Impair Neurons. *Nature* 15(9), pp.1227–1235.

Umeda, T. et al., 2015. Intracellular amyloid β oligomers impair organelle transport and induce dendritic spine loss in primary neurons. *Acta Neuropathologica Communications*, 3(1), p.51.

V

Van der Kant, R. & Goldstein, L.S.B., 2015. Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein from Development to Dementia. *Developmental Cell*, 32(4), pp.502–515.

Varga E. et al., 2015. Amyloid- β_{1-42} Disrupts Synaptic Plasticity by Altering Glutamate Recycling at the Synapse. *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 45, no. 2, pp. 449-456.

W

Walsh, D.M. et al., 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416(6880), pp.535–539.

Wang, H. et al., 2000. Amyloid- β 1-42 Binds to α -7 Nicotinic Acetylcholine Receptor with high affinity. *Biochemistry*, 275(8), pp.5626-5632.

Wang, Q. et al., 2008. α v Integrins Mediate Beta-Amyloid Induced Inhibition of Long-Term Potentiation. *Neurobiology of Aging*, 29(10), pp.1485–1493

Welzel, A.T. et al., 2014. Secreted amyloid β -proteins in a cell culture model include N-terminally extended peptides that impair synaptic plasticity. *Biochemistry*, 53(24), pp.3908–21.

Wegner, A.M. et al., 2008. N-WASP and the Arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), pp.15912–15920.

Weiler R. et al., 1995. Retraction of spinule-type neurites from carp retinal horizontal cell dendrites during dark adaptation involves the activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *European Journal of Neuroscience*. Sep 1;7(9):1914-9.

Weiler R, et al., 1996. Ca^{2+} -dependency of spinule plasticity at dendrites of retinal horizontal cells and its possible implication for the functional role of spinules. *Vision Research*. Dec;36(24):3891-900.

Westrum L. E. and Blackstad T. W. 1962. An electron microscopic study of the stratum radiatum of the rat hippocampus (regio superior, CA 1) with particular emphasis on synaptology. *Journal of Comparative Neurology*. Dec;119:281-309.

Whitlock, J.R. et al., 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5790), pp.1093–1097.

Willem, M. et al., 2015. η -Sécrétase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature*, 526(7573):443-7

Wischik, C.M. et al., 1985. Subunit structure of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *The Journal of cell biology*, 100(6), pp.1905–1912.

Witcher M. R. et al., 2007. Plasticity of Perisynaptic Astroglia During Synaptogenesis in the Mature Rat Hippocampus. *Glia*, 55:13–23

Woo, J. a et al., 2015. Slingshot-Cofilin activation mediates mitochondrial and synaptic dysfunction via $\text{A}\beta$ ligation to β 1-integrin conformers. *Cell Death and Differentiation*, 22(6), pp.921–934.

X

Xie Z. et al., 2007. Kalirin-7 controls activity-dependant structural and fonctionnal plasticity of dendritic spines. *Neuron*, Nov. 22, 56(4) :640-656.

Y

Yen, S.H. et al., 1983. Neurofibrillary tangles in senile dementia of the Alzheimer type share an antigenic determinant with intermediate filaments of the vimentin class. *The American journal of pathology*, 113(3), pp.373–381.

Youn, H. et al., 2007. Kalirin is under-expressed in Alzheimer's disease hippocampus. *Journal of Alzheimer's disease*. 11, 385-397.

Yu, X. & Zheng, J., 2011. Polymorphic structures of alzheimer's β -amyloid globulomers. *PLoS ONE*, 6(6).

Yuste, R., and Bonhoeffer, T., 2004. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature Reviews Neuroscience*. 5, 24-34.

Z

Zhao, L. et al., 2006. Role of p21-activated kinase pathway defects in the cognitive deficits of Alzheimer disease. *Nature Neuroscience*, 9(2), pp.234–242.

Zhao W. Q. et al., 2010. Inhibition of Calcineurin-mediated Endocytosis and α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic Acid (AMPA) Receptors Prevents Amyloid β Oligomer-induced Synaptic Disruption. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Mar 5; 285(10): 7619–7632.

Zheng, B. et al., 2009. Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *FEBS Journal*, 276(10), pp.2669–2685.

Zhou, Q. et al., 2004. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, 44 (5), pp.749–757.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative pathology associated with progressive cerebral atrophy linked to neuronal death. It has been recently suggested that loss of cognitive functions occurring during the disease was a consequence of synapse dysfunction and prior to neuronal death. Thus, it has been observed that Amyloid- β peptide ($A\beta$), the main component of senile plaques, one of the histological markers of the disease, also exists as soluble/oligomeric $A\beta$ ($A\beta_o$). This $A\beta$ conformation is known to be synaptotoxic. $A\beta_o$ acts preferentially on the post-synaptic compartment of excitatory synapses, also named dendritic spines. These sub-cellular micro-domains contain dynamic and filamentous actin as their main cytoskeleton component. Among numerous theories explaining $A\beta_o$ synaptotoxicity, it has been suggested that spine collapsing was due to an abnormal actin depolymerisation through Cofilin1 enzyme. Yet, recent evidence inversely showed Cofilin1 phosphorylation/inactivation in the frontal cortex of AD patients and in the APP/PS-1 transgenic mice brain, an AD animal model. Moreover, synapse morphological analysis in the CA1 region of APP/PS-1 mice showed a reduction in spine density and an increase in spine head volume of remaining ones. Spine head volume variations are commonly occurring during induction of Long Term Potentiation, the electrophysiological correlate of memory.

During my thesis, we firstly characterized APP/PS-1 mice dendritic spine morphological alterations using electron microscopy. We confirmed that even at 3 months-old, excitatory synapses are fewer, but also that remaining ones display larger surfaces. In addition, PSD thickness is not proportional to spine surface anymore, which suggests an uncoupling between functional and morphological modifications. We also demonstrated the presence of abnormal shaped spinules onto spines.

Using primary cortical neuron cultures, we demonstrated that acute $A\beta_o$ treatment induces the formation of filamentous actin enriched protrusions, resembling abnormal spinules observed in transgenic mice. By purifying the post-synaptic protein fraction, we showed that protrusion formation is correlated to an abnormal Cofilin1 phosphorylation/inactivation by $A\beta_o$. Thus, resulting Cofilin1 inactivation could trigger actin filament stabilization, leading to protrusion formation. We also found Cofilin1 phosphorylation in APP/PS-1 mice and in AD brains. Taken together, these results show that $A\beta_o$ triggers abnormal alterations of dendritic spines, and spinules. These protrusions are not activity-dependent, but may instead originate from a dysregulation of Cofilin1 enzymatic activity by $A\beta_o$.

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative caractérisée par une atrophie cérébrale progressive associée à une mort neuronale. Plus récemment, il a été suggéré que la perte des fonctions cognitives survenant pendant la maladie s'expliquait principalement par une atteinte au niveau synaptique préalable à la mort neuronale. Ainsi il a été observé que le peptide β -amyloïde ou A β , le constituant des plaques séniles, l'un des deux marqueurs histologiques de la maladie, existe sous une forme soluble/oligomérique (A β o), et cette conformation lui confère des propriétés synaptotoxiques. L'A β o agit préférentiellement sur le compartiment post-synaptique des synapses excitatrices également appelées épines dendritiques, structures sub-cellulaires dont la forme est régie par un cytosquelette d'actine riche et dynamique. Parmi les nombreuses hypothèses émises pour expliquer la synaptotoxicité de l'A β o, il a été suggéré que la disparition des épines était due à une dépolymérisation anormale des filaments d'actine par une enzyme : la cofiline. Pourtant des données récentes ont montré à l'inverse une phosphorylation/inactivation de la cofiline dans le cortex frontal de patients MA, mais aussi dans le cerveau de la lignée de souris APP/PS-1, modèle de MA. De plus, des analyses morphologiques des synapses de la région CA1 chez la souris APP/PS-1 ont montré une réduction de la densité d'épines, associée à une augmentation du volume des épines survivantes. Les variations de volume de la tête de l'épine sont des phénomènes très fréquents lors d'une induction de potentialisation à long terme, le corrélat électrophysiologique de la mémoire.

Au cours de ma thèse, nous avons cherché dans un premier temps à caractériser les altérations morphologiques des épines dendritiques chez la souris APP/PS-1 par microscopie électronique. Nous avons pu confirmer que dès 3 mois, les synapses excitatrices sont moins nombreuses, que les épines restantes sont plus larges, mais surtout, que l'épaisseur de la densité post-synaptique n'est plus proportionnelle à la surface de l'épine, ce qui suggère un découplage entre modifications morphologiques et fonctionnelles. Nous avons également mis en évidence la présence de spinules anormaux sur les épines.

En utilisant des cultures primaires de neurones corticaux, nous avons pu montrer qu'un traitement aigu avec de l'A β o induit la formation de protrusions riches en actine filamenteuse ressemblant aux spinules observés chez les animaux transgéniques. En purifiant la fraction post-synaptique, nous avons démontré que cette formation de protubérances est concomitante à une phosphorylation anormale de la cofiline induite par l'A β o. Ainsi l'inactivation de la cofiline qui en résulte pourrait être à l'origine d'une stabilisation et donc d'un allongement des filaments d'actine synaptique conduisant à la formation des protrusions. Cette inactivation de la cofiline a également été retrouvée chez la souris APP/PS-1 et chez l'humain. En conclusion, l'ensemble des résultats de cette thèse montre que l'A β o induit des déformations morphologiques des épines, qui ne sont pas activité-dépendantes, mais proviennent plutôt d'une dérégulation de l'activité enzymatique de la cofiline par l'A β o.